



Pedro Miguel Lopes Moreira

Licenciado em Biologia

**Role of Notch signaling on the differentiation of
early lymphoid progenitors cells: a view
throughout the development of the embryonic
chicken thymus and spleen.**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Isabel Alcobia Príncipe Henriques

Co-Orientador: Rita Maria Pulido Garcia Zilhão

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Santos Sanches

Arguentes: Prof. Doutora Rita Leonor Alvares Cabral Figueiredo Fior Sousa Soares

Vogal: Prof. Doutora Isabel Alcobia Príncipe Henriques



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2014

Pedro Miguel Lopes Moreira

Licenciado em Biologia

**Role of Notch signaling on the differentiation of
hematopoietic progenitors cells: a view
throughout the development of the embryonic
chicken thymus and spleen.**

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof. Doutora Isabel Alcobia Príncipe Henriques

Co-Orientador: Prof. Doutora Rita Maria Pulido Garcia Zilhão

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ilda Santos Sanches

Arguentes: Prof. Doutora Rita Leonor Alvares Cabral Figueiredo Fior Sousa Soares

Vogal: Prof. Doutora Isabel Alcobia Príncipe Henriques

Março de 2014

COPYRIGHT

Role of Notch signaling on the differentiation of early lymphoid progenitors cells: a view throughout the development of the embryonic chicken thymus and spleen.

Copyright Pedro Miguel Lopes Moreira, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos:

Quero agradecer em primeiro lugar, à professora Hélia, pela oportunidade que me deu de fazer parte do seu grupo. Pela dedicação e preocupação que sempre mostrou comigo e com o meu trabalho. Pela autonomia que me proporcionou e por tudo o que aprendi durante este ano.

Em segundo lugar, agradeço muito à professora Isabel, por me ter orientado durante esta nova aventura e por me ter ensinado e apoiado em todas as alturas. Por todos os seus conselhos e palavras de entusiasmo diário. Em terceiro, agradeço à professora Rita por todo o seu conhecimento, por todos os conselhos que me deu durante a escrita da tese. A toda a Unidade de Biologia da Hematopoiese do Instituto de Histologia e Biologia do Desenvolvimento da FMUL por me terem recebido muito bem e por me terem deixado à vontade desde o primeiro dia. Em particular, ao Vítor, por tudo o que me ensinou, pela companhia, por toda a ajuda e apoio que me deu durante estes meses de trabalho árduo. À Joana pelos sorrisos e pela companhia e por estar sempre na potência máxima. A Sofia e Marta, pela sua companhia diária e pelo esclarecimento de qualquer dúvida. À Margarida (pela oportunidade que me deu de partilhar o meu conhecimento) e à Carlota, que tornavam o nosso espaço mais preenchido e, conseqüentemente, mais alegre.

Um grande obrigado a todos os amigos que acompanharam esta fase de mudança da minha vida.

Um obrigado à professora Rita Fior por me ter aberto as portas da área da biologia de desenvolvimento, até então tão desconhecida para mim.

Um grande obrigado ao João Tavanéz, Alice, Vanda, Nádia, Leila, Ana Girio, Rita, Daniel e Leonor da UBCA por toda a companhia, amizade e conselhos no laboratório. Ao João Pereira da UDEV por me ter aconselhado, ajudado e ter dado ideias sempre que precisei.

Deixo aqui um grande obrigado para as meninas da histologia, Andreia e Margarida, por toda a ajuda e pelo tempo bem passado.

Um enorme obrigado a unidade de UBI, em especial ao António e à Margarida, por me terem ensinado tudo e por terem paciência para me responder ao meu rol de perguntas infundável.

Ao Nuno pelos anos de amizade. Por me ter apoiado, por me ouvir e dar sempre ideias para o futuro. Obrigado também por me convidares para tudo e alguma coisa. Obrigado por demonstrares que a distância não é nada para uma grande amizade.

A Rita, por ser a minha mais que tudo, por me ouvir, dar ideias e discutir comigo todos os problemas e por me ajudar sempre a melhorar. Obrigado ainda por todo o apoio que me deste quando precisei.

À minha família, pela confiança ilimitada nas minhas capacidades, por me proporcionarem esta oportunidade tão longe de casa e por fazerem os possíveis e impossíveis por mim. Obrigado por tudo o que me deram durante a vida.

Por fim, deixo mais um grande mas mesmo grande obrigado a todas as pessoas a quem já agradei anteriormente, por me terem ido visitar ao hospital quando a minha saúde não estava na mó de cima. Obrigado também por terem perguntado por mim sempre que podiam e pela preocupação demonstrada desde o primeiro dia de internamento. Deixo ainda um especial obrigado às pessoas do L. Saúde's lab e da Fish Facility que se preocuparam comigo.

Resumo

Os órgãos linfóides, timo e o baço, são essenciais para a diferenciação das células T e B, respectivamente. Uma das vias de sinalização envolvida nos processos de diferenciação celular é a via de sinalização Notch. Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram que ligandos, receptores e genes alvo de Notch são expressos no epitélio tímico.

Os objectivos deste projecto incluíam: 1) estudar a organogénese do timo e baço em embriões de galinha; 2) caracterizar fenotipicamente as células presentes em ambos os órgãos; 3) estudar o papel da sinalização Notch na diferenciação dos progenitores hematopoiéticos (PH) isolados do timo e do baço do embrião da galinha.

Para estudar a formação do timo e do baço e caracterizar as populações celulares neles existentes durante o desenvolvimento embrionário, fizeram-se colorações HE em cortes histológicos dos órgãos e *citospins*.

Para elucidar o papel da sinalização Notch na diferenciação dos PH utilizámos um sistema de co-cultura de PH com células estromais que expressam diferentes ligandos Notch, *Delta 1* (DI1) e *Delta 4* (DI4). Os resultados obtidos confirmam que o baço, é desde cedo (E6) um órgão muito vascularizado e que número de PH começa a aumentar a partir de dia E10. Em relação ao timo, a regionalização em córtex e medula ocorre no dia E8 e não se detectaram células da crista neural durante os vários estádios de desenvolvimento estudados. Concluímos também que as células hematopoiéticas recolhidas do timo ao dia E15 são mais diferenciadas que as células de timos E13. Os resultados das co-culturas demonstraram que o ligando de Notch, DI1 parece favorecer a proliferação/sobrevivência dos CPL. Assim, o ligando DI1 poderá possuir um papel preponderante nos estádios iniciais da diferenciação T. Estas evidências parecem confirmar ainda que os CPL mais indiferenciados são capazes de responder mais eficientemente a estímulos externos e diferenciarem-se mais eficientemente em células T.

Palavras-chave: sinalização Notch – Delta1; organogénese; timo; baço; progenitores hematopoiéticos; células B; células T; Co-culturas *in vitro*;

Abstract

The lymphoid organs, thymus and spleen, are essential for the differentiation of T and B cells, respectively. One of the signaling pathways involved in processes of cell differentiation is the Notch signaling pathway. Work conducted by our group demonstrated that Notch ligands, receptors and target genes are expressed in the thymic epithelium.

In this work, we aimed: 1) to study the organogenesis of the thymus and spleen in chicken embryos; 2) phenotypically characterize the cells present in both organs; 3) to study the role of Notch signaling in the differentiation of hematopoietic progenitors (PH) isolated from thymus and spleen of the chicken embryo.

To study the formation of the thymus and spleen and characterize the cell populations present within them during embryonic development, we stained histological sections of the organs and *citospins* with Hematoxylin-Eosin (HE). To elucidate the role of Notch signaling in the differentiation of the PH, we used a co-culture system of PH with stromal cells that express specific *Notch* ligands, *Delta 1* (DI1) and *Delta 4* (DI4).

The results confirm that, the spleen is an early (E6) vascularized organ and the number of PH in the spleen increases after day E10. In the thymus, the regionalization in cortex and medulla occurs at day E8 and there are no visible neural crest cells during the several embryonic stages studied. We conclude that hematopoietic cells collected from the thymus at day E15 are more differentiated than cells collected from thymus E13. The co-cultures results demonstrated that the Notch ligand DI1 appears to favor the lymphoid progenitor cells (LPC) proliferation/survival. Thus, the DI1 ligand may have an important role at the early stages of T cell differentiation. Moreover, these evidences seem to confirm that the undifferentiated LPCs are able to respond more effectively to external stimulus and differentiate into T cells more efficiently.

Keywords: Notch signaling – Delta1; organogenesis, thymus, spleen, hematopoietic progenitors, B cells, T cells, co-cultures *in vitro*;

Índice:

Agradecimentos:	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice de figuras	IX
Índice Tabelas:	XIII
Lista de abreviaturas	XV
1. Introdução:	1
1.1. Hematopoiese:	1
1.2. O modelo galinha (<i>Gallus gallus</i>) na biologia do desenvolvimento	2
1.3. Hematopoiese na galinha	3
1.4. Desenvolvimento do timo	5
1.5. Diferenciação das células T	9
1.6. Organogénese do Baço	13
1.7. Organogénese da bursa de Fabricius	15
1.8. Diferenciação das células B	16
1.9. Sinalização Notch	19
1.10. Objectivos	22
2. Métodos:	23
2.1 Manipulação dos embriões de galinha	23
2.2 <i>Citospins</i>	23
2.3 Coloração Hematoxilina-Eosina	24
2.4. Captação de imagem (Axiovert 200M)	24
2.5. Secções dos órgãos isolados	24
2.6. Imunohistoquímica	25
2.7. Coloração Hematoxilina-Eosina	26
2.8. Ensaio de Co-cultura	26
3. Resultados:	31
3.1. Organogénese do timo	31
3.2. Organogénese do baço	34
3.3. Análise histológica das células isoladas de timos	36
3.4. Análise fenotípica das células isoladas de baço	38
3.5. Co-cultura de progenitores hematopoiéticos isolados de timos	40
3.6. Co-cultura de progenitores hematopoiéticos isolados de Baço	47
4. Discussão	57
4.1. Organogénese do timo	58
4.2. Caracterização das células presentes no timo	59
4.3. Organogénese do baço	59
4.4. Caracterização das células presentes no baço	60
4.5. OP9-DI1 suporta a diferenciação dos CPL em células T	61
5. Conclusão	64
5.1. Perspectivas Futuras	64
Referências	65
Apêndice	71

Índice de figuras:

Figura 1.1 - Hierarquia celular da hematopoiese.	1
Figura 1.2 - Linha temporal do desenvolvimento dos diferentes órgãos hematopoiéticos no modelo da galinha.	5
Figura 1.3 - Fases de especificação das células epiteliais tímicas (CETs).	6
Figura 1.4 - Representação esquemática de uma secção coronal da região faríngea	7
Figura 1.5 - Expressão de Foxn1 e Gmc2 nas bolsas faríngeas do embrião de galinha.	7
Figura 1.6 - Rotas de migração dos CPL da linhagem T.	9
Figura 1.7 - Representação esquemática dos três loci diferentes dos TCR da galinha (loci α/δ (no topo), β (ao meio e γ (em baixo).	10
Figura 1.8 - Expressão de proteínas específicas de sub- durante o processo de diferenciação na linhagem T.	11
Figura 1.9 - Representação de uma secção do timo adulto durante o processo de diferenciação e especificação da linhagem T.	13
Figura 1.10 - Linha temporal do desenvolvimento do baço no embrião de galinha.	14
Figura 1.11 - Aspecto morfo-histológico da bursa de Fabricius após o nascimento.	15
Figura 1.12 - Esquema representativo do rearranjo dos genes Ig.	17
Figura 1.13 - Esquema representativo da conversão génica.	18
Figura 1.14 Esquema representativo do processo de conversão génica.	18
Figura 1.15 - Via de sinalização Notch.	20
Figura 2.1 - Representação do processo experimental para obter um <i>citospin</i>	23
Figura 2.2 – Representação esquemática do procedimento experimental de obtenção de PH de timos E13 e E15 e de baços E10.	27
Figura 2.3 - Co-cultura de PH com células estromais S17/OP9. . .	28
Figura 3.1 – Corte sagital de embriões de galinha com 6 dias de desenvolvimento..	31
Figura 3.2 – Corte Transversal de embrião de galinha com 8 dias de desenvolvimento.	32
Figura 3.3 – Timos isolados de embriões de galinha com 10 e 12 dias de desenvolvimento.	32
Figura 3.4 – Corte Transversal de timo isolados de embriões de galinha com 14 dias de desenvolvimento.	33

Figura 3.5 – Corte Transversal de baços isolados de embriões de galinha com 6 e 8 dias de desenvolvimento.	34
Figura 3.6 – Corte Transversal de baços isolados de embriões de galinha com 10 dias de desenvolvimento..	35
Figura 3.7 – Corte Transversal de baço isolado de embriões de galinha com 12 e 14 dias de desenvolvimento.....	35
Figura 3.8 – Distribuição dos vários tipos celulares presentes em timos com 10, 12 e 14 dias de desenvolvimento.	36
Figura 3.9 - Categorias morfológicas utilizadas para a análise de células isoladas de timos e baços.	37
Figura 3.10 - Percentagem de células isoladas de baços com 10, 12 e 14 dias de desenvolvimento..	39
Figura 3.11 - Análise fenotípica de populações de células hematopoéticas presentes no timo com 13 (n=1) e 15 (n=2) dias de desenvolvimento.	41
Figura 3.12 - Análise da densidade celular obtida nas várias condições de co-cultura..	42
Figura 3.13 - Tamanho e complexidade citoplasmática de células hematopoéticas isoladas de timos com 13 dias de desenvolvimento.....	43
Figura 3.14 - Número de células hematopoéticas E13 que expressam CD4 e CD8 durante a co-cultura.	44
Figura 3.15 - Densidade celular de progenitores hematopoiéticos nas várias condições de co-cultura (OP9-WT, OP9-Ø, OP9-DI1, OP9-DI4)..	44
Figura 3.16 - Tamanho e complexidade citoplasmática de células co-cultivadas isoladas de timos com 15 dias de desenvolvimento.....	45
Figura 3.17 - Número de células hematopoéticas de G2 que expressam CD3, CD4 e CD8 durante a experiência de co-cultura.	46
Figura 3.18 - Número de células isoladas de baço ao longo do desenvolvimento embrionário (E7 – E17) da galinha.....	48
Figura 3.19 - Análise fenotípica de populações de células hematopoéticas presentes no baço com 10 dias de desenvolvimento (n=3).	49
Figura 3.20 - Análise da viabilidade celular das suspensões obtidas nas diferentes condições de co-cultura (S17-WT, S17-DI1)..	50
Figura 3.21 - Análise por citometria dos padrões de células hematopoiéticas.	51
Figura 3.22 - Número de células que expressam CD4, CD8, MM e Bu1a durante a experiência de co-cultura com progenitores isolados de baços com 10 dias de desenvolvimento.....	53

Figura 3.23 - Análise da viabilidade celular das suspensões obtidas nas diferentes condições de co-cultura (WT, DI1 e DI4).	54
Figura 3.24 - Análise por citometria dos padrões de células hematopoiéticas.	55
Figura 3.25 - Número de células que expressam CD4, CD8 e Bu1a durante a experiência de co-cultura (#2) com progenitores isolados de baços com 10 dias de desenvolvimento.	56

Índice Tabelas:

Tabela 2.1. Anticorpos utilizados em citometria de fluxo.	30
--	----

Lista de abreviaturas

AF	Arcos Faríngeos	HRP	Horseradish Peroxidase
BF	Bolsas Faríngeas	CEH	Célula Estaminais Hematopoiéticas
Bmp	<i>Bone morphogenic protein</i>	IHC	Imunohistoquímica
BSA	Bovine Serum Albumin	mCET	Células Epiteliais Tímicas da medula
cCET	Célula Epitelial Tímica do córtex	MHC	Major Histocompatibility Complex
CD	Célula Dendrítica	µm	Micrómetro
CH	Célula Hematopoiética	MO	Medula Óssea
CPL	Célula Progenitora Linfóide	NC	Célula da Crista Neural
CPA	Células apresentadoras de antígenos	NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
ddH₂O	Água destilada	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
DI1/DI4	Delta1/Delta4	Pen/Strep	Penicilina/Streptomicina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	PFA	Paraformaldeído
DN	Duplos Negativos	PS	<i>Seleção Positiva</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	RAG1	<i>Recombinase-Activating Genes 1</i>
DP	Duplos Positivos	RAG2	<i>Recombinase-Activating Genes 2</i>
E	Dia Embrionário	RNA	Ácido Ribonucleico
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>	RPM	Rotações por minuto
FBS	Soro Fetal Bovino	SAV	Streptavidina
Fgf	Fibroblast growth factor	SN	Seleção Negativa
Foxn1	<i>Forkhead box N1</i>	SP	<i>Single Positive</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>	TCR	Receptor das Células T
Gcm2	Glial cells missing 2	TE	Células Epiteliais do Timo
h, min, sec, ms	hora, minutos, segundos, milissegundos	TN	Triplas Negativas
HE	Hematoxilina-Eosina	WT	<i>Wild type</i>

Capítulo 1: Introdução

1. Introdução:

1.1. Hematopoiese:

A hematopoiese é o processo pelo qual as células hematopoiéticas indiferenciadas (células estaminais hematopoiéticas - CEH) proliferam e se diferenciam nas diferentes linhagens celulares presentes no sangue e sistema imunitário, como por exemplo a linhagem linfóide e mieloide (Figura 1.1).

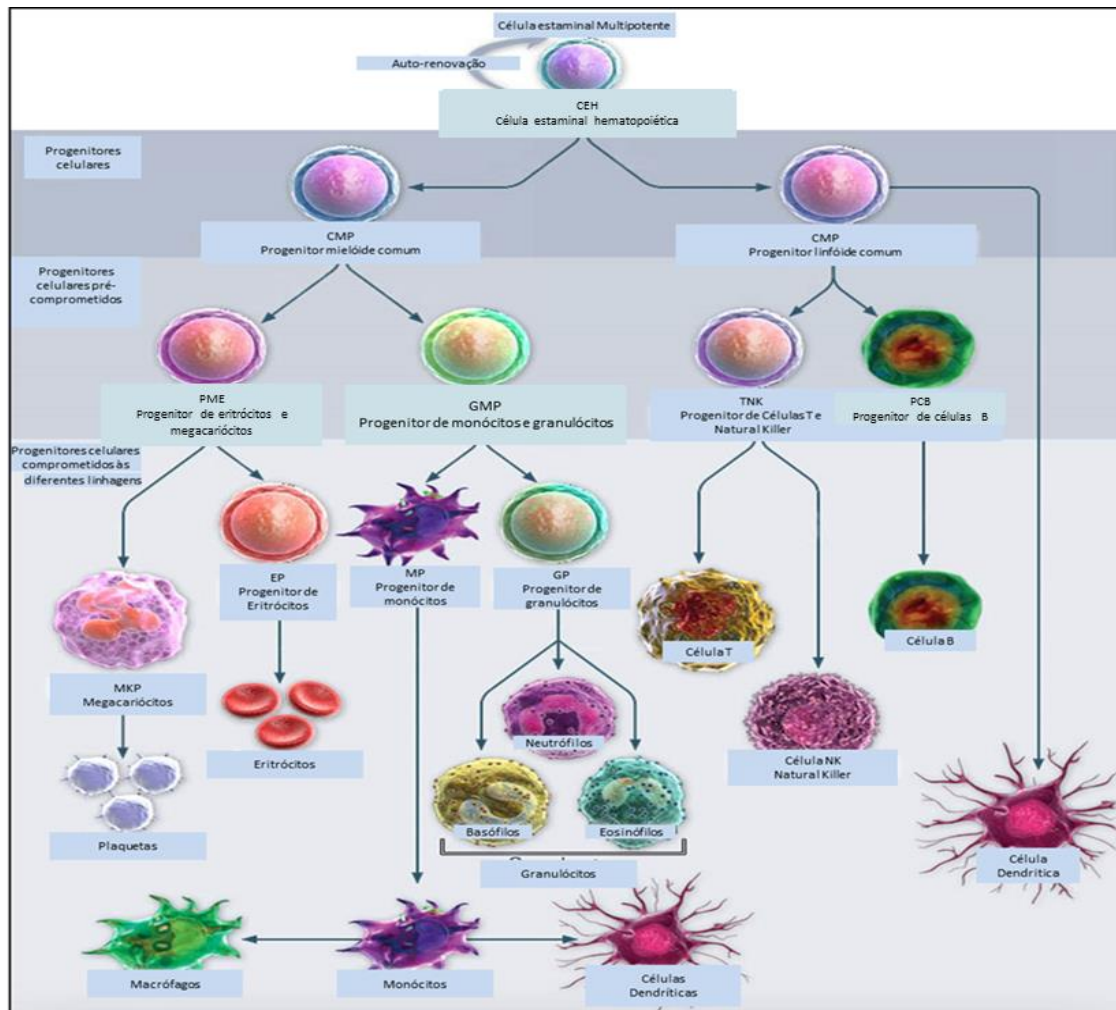


Figura 1.1 - Hierarquia celular da hematopoiese. Células estaminais hematopoiéticas (CEH) dão origem a progenitores específicos de linhagens celulares distintas, como por exemplo progenitores de células B (PCB), Células T (TNK) e progenitores de Megacariócitos e Eritrócitos (PME). Estes progenitores darão origem aos diferentes tipos celulares diferenciados do sistema hematopoiético, como células B, células T, monócitos, megacariócitos, células dendríticas e granulócitos. Adaptado de eBioscience 2012 (<http://www.ebioscience.com/resources/pathways/hematopoiesis-from-multipotent-stem-cells.htm>)

As células do sangue são responsáveis pela constante manutenção de todas as células do corpo e pela resposta imunitária. Para além disso, a diferenciação hematopoiética tem servido de paradigma para compreender melhor a biologia das células estaminais dos diferentes tecidos, os

mecanismos de envelhecimento e o seu envolvimento em doenças hematológicas e oncogénese (como a leucemia, linfomas).

O sangue é maioritariamente constituído por células maduras com um período médio de vida curto, que necessitam de ser substituídas regularmente. Consequentemente, as CEH desempenham um papel importante ao longo de toda a vida de um organismo na reposição de progenitores das diferentes linhagens celulares e posteriormente a na sua diferenciação.

Os processos de diferenciação das células hematopoiéticas têm sido extensamente estudados para entender como as CEH e cada progenitor hematopoiético dão origem aos diferentes tipos de células hematopoiéticas. Isto tem servido como base para a criação de novas terapêuticas que utilizam CEH, como por exemplo os transplantes de medula óssea. As terapêuticas que utilizam CEH são actualmente prática comum e, o transplante destas células, têm salvado a vida de milhares de pessoas com leucemia, linfomas e doenças hematológicas hereditárias. A título de exemplo, existem doenças relacionadas com o sistema imunitário que estão, também, associadas a doenças ligadas ao cromossoma X combinadas com síndrome de imunodeficiência (como por exemplo doenças relacionadas com o sistema imunitário - Doenças severas ligadas ao cromossoma X combinadas com síndromes de imunodeficiência (SCID) (van der Burg e Gennery, 2011).

1.2. O modelo galinha (*Gallus gallus*) na biologia do desenvolvimento:

A galinha é um dos modelos mais antigos utilizados na área da biologia do desenvolvimento. Este modelo assemelha-se aos vertebrados superiores mantendo a vantagem de manipulação *in ovo*. Além disso, o seu sistema imunitário apresenta uma vantagem para estudos de imunologia básica, dado que a diferenciação das linhagens celulares B e T ocorrem órgãos distintos (baço/bursa de Fabricius e timo, respectivamente) (Fred Davison, 2008). A separação destes processos permite um melhor entendimento dos processos moleculares e das diferentes vias de sinalização envolvidas na especificação das células B e T.

Este modelo apresenta outras vantagens que o tornam um modelo importante e fácil de manipular, como por exemplo o tamanho do embrião, a disponibilidade dos embriões, o seu baixo custo e a facilidade com que são colocados a incubar até períodos específicos do seu desenvolvimento embrionário (Douarin e McLaren, 1984). O facto de os embriões estarem dentro de uma casca calcificada permite o acesso directo ao embrião e à manipulação *in ovo*. A manipulação *in ovo* tem sido utilizada como base para a construção de várias quimeras interespecíficas (quimeras codorniz-galinha), através da transplantação de tecidos de um animal para outro como, por exemplo, a transplantação de enxertos de tubo neural, saco vitelino entre outros (Douarin e McLaren, 1984). Este sistema de quimeras provou ser importante dado que permitiu estudar a origem das células estaminais hematopoiéticas (Dieterlen-Lievre, 1975). A utilização de quimeras possibilitou, ainda, o estabelecimento de análises de destino celular, acompanhando *in vivo* o processo de migração de um

grupo específico de células e a sua contribuição para o desenvolvimento de tecidos em estudo (Dieterlen-Lievre, 1975).

O sistema de quimeras utilizado por Le Douarin nos anos 60 (quimera galinha-codorniz) baseava-se na morfologia dos núcleos das células para identificar os tecidos de codorniz, que apresentam uma cromatina mais condensada que a da galinha. Actualmente, também, é possível fazer esta distinção com base em anticorpos específicos de espécie. O anticorpo QCPN (Hybridoma Bank) reconhece especificamente todas as células de codorniz permitindo a identificação do tecido com origem na codorniz (Douarin e Kalcheim, 1999). Por outro lado, o anticorpo TAP-1 (Hybridoma Bank) detecta células B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas de galinha.

Além destas características, o genoma da galinha partilha 50% dos genes com o genoma humano, o que reforça a sua relevância como um modelo para a biologia do desenvolvimento. (Bourikas e Stoeckli, 2003; Stern, 2004; Prescott, 2008). Técnicas de transferência génica, nomeadamente a electroporação de embriões de galinha, são um dos métodos mais utilizados no campo da biologia do desenvolvimento. O desenvolvimento de técnicas de transferência génica, nomeadamente a electroporação em embriões de galinha tem sido, também, uma vantagem no campo da biologia de desenvolvimento.

1.3. Hematopoiese na galinha:

A caracterização fenotípica e funcional da hematopoiese na galinha está tão avançada como nos mamíferos. Estudos realizados por Jaffredo *et al.* (2005b) demonstraram que as CEH dos embriões de galinha têm origem em três locais distintos: inicialmente no saco vitelino (extra-embrionário), seguido da região aórtica (intra-embrionário) e da alantóide (Figura 1.2). Na galinha, tal como nos mamíferos, a hematopoiese inicia-se nas ilhas de sangue localizadas no saco vitelino (Figura 1.2). Estas ilhas de sangue são normalmente constituídas por uma camada externa de células endoteliais e uma parte central de células hematopoiéticas (CH). Foi demonstrado por Szenberg (1977), que ao dia embrionário 6 (E6) estas CH são capazes de se diferenciar e dar origem a células pertencentes à linhagem mielóide. Como referido anteriormente, durante estes primeiros passos da hematopoiese, o embrião não intervém na diferenciação e produção das células hematopoiéticas.

Moore e Owen (1965) demonstraram que as CH que tinham origem no saco vitelino (de embrião de codorniz) vão colonizar os diferentes órgãos hematopoiéticos definitivos do embrião de galinha. Com base neste estudo, o saco vitelino foi considerado a fonte principal de CEH. No entanto, o potencial do saco vitelino para produzir CEH é limitado, dado que a partir de E10 a sua produção é reduzida (revisto por Dieterlen-Lievre e Le Douarin, 2004). Uma das regiões do embrião que, também, apresenta potencial para produzir CEH é a região da aorta (Dieterlen-Lievre e Martin, 1981). Nesta região a produção de CEH ocorre durante um período de tempo mais alargado comparativamente ao saco vitelino (Figura 1.2), e tem início a partir de E3 (Figura 1.2) (revisto por Jaffredo *et al.*, 2005a). Na galinha, a região aórtica apresenta dois períodos de hematopoiese distintos na galinha (revisto por Jaffredo *et al.*, 2005a): (1) O primeiro período ocorre entre E3 e E4.

Um estudo conduzido por Dieterlen-Lievre e Martin (1981) revelou a existência de células com características de CH na face ventral da região aórtica – estes *clusters* de células foram denominados por agrupamentos intra-aórticos (*intra-aortic clusters*). (2) O segundo período ocorre entre E7 e E9. Dieterlen-Lievre e Martin (1981) demonstraram que neste segundo período um conjunto de células menos compactadas começava a proliferar no mesentério externo da região ventral da aorta – estes agrupamentos são denominados focos para-aórticos.

Em ambos os casos, foi demonstrado que os agrupamentos de células da região aórtica (intra-aórticos e focos para-aórticos) têm origem em células especializadas denominadas de hemangioblastos (Murray, 1932). Posteriormente foi demonstrado que a alantóide tem uma função hematopoiética importante (Caprioli *et al.*, 2001) (Figura 1.2). Estes estudos também se basearam no sistema de quimeras galinha-codorniz, onde uma alantóide de codorniz foi transplantada para um embrião de galinha, provando-se que a alantóide era capaz de produzir células endoteliais e CH que iriam colonizar a medula óssea (MO) (Caprioli *et al.*, 2001).

Em contraste com os mamíferos, onde o fígado fetal possui uma função hematopoiética importante e é o primeiro órgão a ser colonizado por CH, nas aves o primeiro órgão a ser colonizado por CH é o baço seguido da colonização do timo e da medula óssea (Jaffredo *et al.*, 2005b) (Figura 1.2). No baço a colonização inicia-se entre os dias E3,5-E5 e termina ao dia E14 (Figura 1.2) (Jaffredo *et al.*, 2005b). Pelo dia E5 é possível encontrar células B no baço que sofreram rearranjo dos genes das imunoglobulinas (genes Ig). Análises realizadas ao dia E6/E7 demonstraram que o número de células que sofreu rearranjo do locus Ig tinha aumentado ligeiramente (Reynaud *et al.*, 1992) (Ver secção 1.8). Entre o dia E8 e E14 uma onda de progenitores pré-especificados com a linhagem B migra do baço para a bursa de Fabricius (Houssaint *et al.*, 1976).

O timo, por outro lado, é colonizado por três ondas de colonização diferentes a E6, E12 e E18 (Figura 1.2) (Jotereau e Le Douarin, 1982).

Por sua vez, a medula óssea é colonizada pelo dia E10 por progenitores hematopoiéticos proveniente dos focos para-aórticos (Figura 1.2) (Moore e Owen, 1965, 1967; Jotereau e Le Douarin, 1978). A medula óssea das aves não possui um papel importante na diferenciação das células B, como nos mamíferos, mas continua a desempenhar uma função relevante na hematopoiese. Na galinha, tanto no embrião como no adulto, a medula óssea possui nichos de células hematopoiéticas específicos que se desenvolvem dando origem a diferentes tipos de células, que surgem através da eritropoiese, granulopoiese e linfopoiese (Dieterlen-Lievre, 1988).

Estudos sugerem que existem pequenos nichos de células diferentes na medula óssea que são capazes de se diferenciar em tipos de células específicos. Estes nichos de células constituem microambientes específicos presentes na medula óssea que segregam factores essenciais à especificação das diferentes linhagens celulares (Siatskas e Boyd, 2000).

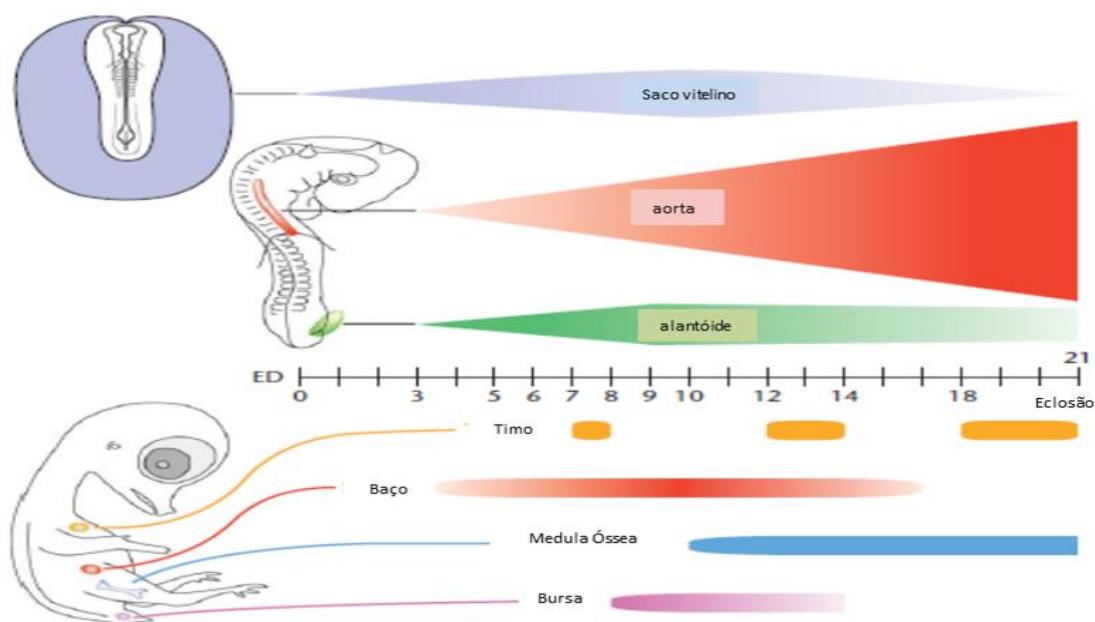


Figura 1.2 Linha temporal do desenvolvimento dos diferentes órgãos hematopoiéticos no modelo da galinha. No meio da figura está a escala em dias de desenvolvimento (ED). Acima da escala, os 3 primeiros locais hematopoiéticos – cinzento: saco vitelino; Vermelho; Região aórtica; Verde: alantóide. Em baixo da escala encontramos os tempos de colonização dos diferentes locais definitivos da hematopoiese. Laranja: as 3 ondas de colonização do timo; Vermelho: Baço; Azul: medula óssea; Roxo: bursa Fabricius. Adaptado de Jaffredo *et al.* (2005b)

1.4. Desenvolvimento do timo:

O timo é um órgão de origem epitelial que se encontra rodeado por uma cápsula de mesênquima. Está presente em todos os vertebrados mandibulados e possui um papel essencial no desenvolvimento do sistema imunitário. Apesar de a sua descoberta ter ocorrido há muitos séculos, a sua função só foi identificada no início dos anos 60 por Jacques Miller através de estudos com ratinhos timectomizados (Miller, 1961). Estes ratinhos timectomizados apresentavam os tecidos linfóides pouco desenvolvidos, e problemas na resposta imunitária que os tornavam susceptíveis a infecções (Miller, 1961).

A organogénese do timo na galinha é um processo complexo que se pode dividir em duas fases diferentes (Figura1.3): (1) A primeira fase é independente de timócitos, que são os progenitores hematopoiéticos do timo. A diferenciação das células epiteliais tímicas (CET), nesta fase, ocorre devido a interações entre as células epiteliais e o mesênquima circundante (Nehls *et al.*, 1996; Rodewald, 2008). (2) A segunda fase é dependente de timócitos que colonizam o timo a partir do dia E6. A partir de dia E6, as células progenitoras linfóides (CPL) que estão a colonizar o timo interagem com as células epiteliais iniciando o processo de diferenciação do epitélio tímico em duas regiões distintas: a região do córtex (cCET) e a região da medula (mCET) (Nehls *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 2009).

Especificação das CETs no embrião de galinha

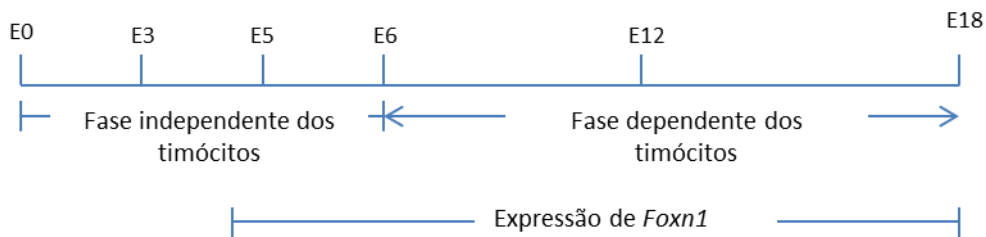


Figura 1.3 Fases de especificação das células epiteliais tímicas (CETs). A fase independente dos timócitos ocorre entre E0 e E6, enquanto a fase dependente dos timócitos ocorre a partir de E6. A expressão de *Foxn1* no epitélio do rudimento tímico começa ao dia E4,5

A identificação dos diferentes domínios prospectivos do timo na endoderme da 3ª bolsa faríngea, deu-se através de ratinhos mutantes para o locus *nude*, que apresenta uma mutação no gene *forkhead box N1* (*Foxn1*) (Nehls *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 2006). O *Foxn1* é um factor de transcrição essencial para a identidade e desenvolvimento do timo (Nehls *et al.*, 1996; Bleul *et al.*, 2006), dado que a colonização do rudimento tímico por CPL está dependente da expressão de *Foxn1* pelo epitélio tímico (Nehls *et al.*, 1994). Além disso, o *Foxn1* é importante para a especificação das CET, pois ratinhos *FoxN1* não são capazes de sofrer especificação das mesmas (Nehls *et al.*, 1994; Nehls *et al.*, 1996).

Na galinha, o timo é composto por sete/oito lobos ligados à veia jugular e ao nervo vago que existe de cada lado do pescoço, sendo que os lobos estão distribuídos a partir da 3ª vértebra cervical até ao segmento superior do tórax (Kendall, 1980).

Foi demonstrado através de quimeras galinha-codorniz, que as células epiteliais tímicas (CET) derivavam da endoderme da 3ª e 4ª bolsas faríngeas (BF) (Le Douarin *et al.*, 1975). As BF são constituídas por duas camadas de células, uma camada de células da ectoderme e uma camada de células da endoderme. (Figura 1.4) (Bleul *et al.*, 2006; Jenkinson *et al.*, 2006; Gordon e Manley, 2011).

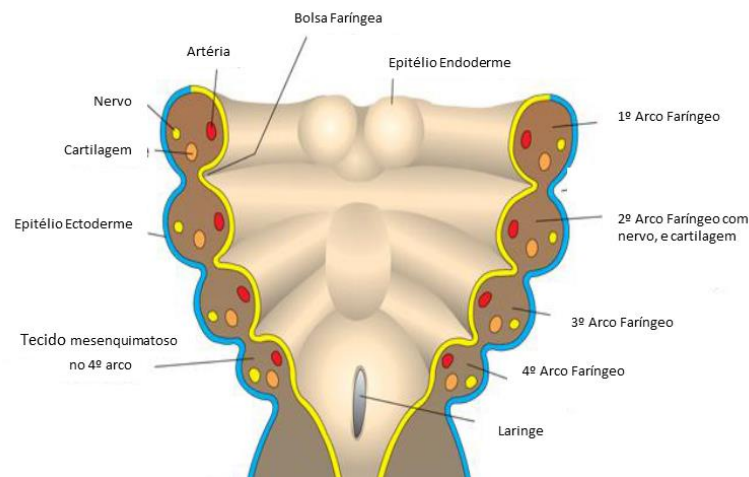


Figura 1.4 Representação esquemática de uma secção coronal da região faríngea. Os arcos faríngeos (AF) são compostos por células do mesênquima e da mesoderme revestidas por uma camada externa de células da ectoderme (azul) e uma camada interna de endoderme faríngea (amarelo). As invaginações formadas pela ectoderme são denominadas de fendas faríngeas que separam os arcos faríngeos. Na posição oposta às fendas faríngeas encontramos invaginações formadas pela endoderme que são denominadas por bolsas faríngeas. Adaptado de Langman's medical embryology 9ª Edição.

O desenvolvimento do timo está intimamente relacionado com o desenvolvimento da paratiróide, uma vez que os primórdios de ambos derivam das mesmas estruturas, a 3ª e 4ª BF (Figura 1.5). O primórdio de ambos divide-se em 2 domínios: no domínio do timo que se localiza na região dorsal das 3ª e 4ª BF e expressa *Foxn1*, e no domínio da paratiróide que se localiza na região anterior da 3ª e 4ª BF e expressa *Glial Cell Missing 2 (Gcm2)* (Nehls *et al.*, 1994; Gunther *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2012) (Figura 1.5).

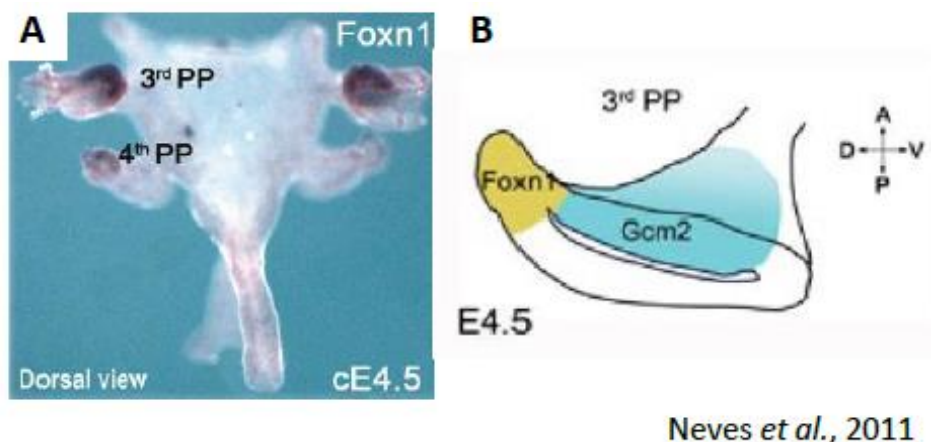


Figure 1.5 Expressão de *Foxn1* e *Gcm2* nas bolsas faríngeas do embrião de galinha. A) – Hibridização *in situ* que demonstra o padrão de expressão do gene *Foxn1*; B) – Representação esquemática dos domínios de expressão de *Foxn1* e *Gcm2* na 3ª BF a cE4, 5. A, anterior; D, dorsal; c, chicken (galinha); P, posterior; PP, pharyngeal pouch (bolsa faríngeas); V, ventral). Adaptado de Neves *et al.*, 2011.

Através da utilização de quimeras galinha-codorniz, Le Douarin demonstrou que endoderme isolada da 3ª e 4ª BF de embriões de galinha com 3 dias de desenvolvimento se podia desenvolver em epitélio tímico se fosse enxertada em mesênquima heterólogo como a somatopleura ou a esplancopleura (Le Douarin *et al.*, 1968). Assim, estes estudos demonstraram que a endoderme isolada era capaz de induzir o mesênquima heterólogo a cooperar na formação de um timo completamente desenvolvido (Le Douarin *et al.*, 1968; Le Douarin *et al.*, 1975). Contudo, quando a endoderme da 3ª e 4ª BF são transplantadas para ambiente de mesênquima não permissivo, como os somitos ou *limb bud*, o timo não se desenvolve (Le Douarin, 1967; Le Douarin *et al.*, 1968). Estes dados foram a primeira evidência de que a comunicação entre a endoderme e mesênquima circundante era crucial para o início do desenvolvimento do timo. Posteriormente, estudos em ratinho revelaram que as células de mesênquima expressam uma cascata de genes composta por *Hoxa3*, *Eya1* e *Six1* que é importante para o desenvolvimento do timo (Gordon e Manley, 2011). Estudos mais recentes levados a cabo por Neves e colaboradores revelaram que sinais moleculares de *Bmp4* e *Fgf10* estão envolvidos na fase inicial do desenvolvimento do timo da galinha. Estes dados suportam que a expressão de *Bmp4* e *Fgf10* pelo mesênquima circundante é essencial para o desenvolvimento do timo e paratiróide (Neves *et al.*, 2012).

O rudimento tímico da galinha separa-se da faringe ao dia E5 (Hamburger e Hamilton, 1992). Durante este processo, a cápsula de mesênquima do timo é formada a partir de células que derivam da crista neural (Le Douarin *et al.*, 1975). Pelo dia E6, o timo do embrião de galinha entra numa segunda fase de desenvolvimento. Nesta fase de desenvolvimento, a especificação do epitélio tímico fica dependente da colonização por CPL e da interacção com estes precursores. Estudos demonstraram que a colonização do timo por CPL é essencial para a especificação do epitélio tímico em medula e córtex (Le Douarin *et al.*, 1984; Nehls *et al.*, 1994; Anderson e Jenkinson, 2001).

Jotereau e Le Douarin (1982) demonstraram que o timo é colonizado por CPL em três ondas de colonização diferentes, ao contrário do que acontece no ratinho (Jotereau *et al.*, 1987). A primeira onda de colonização tem origem nos focos para-aórticos ao dia E6. Como os CPL entram no rudimento tímico é ainda desconhecido (Figura 1.6) (Le Douarin *et al.*, 1975). Estudos realizados por Heinzl *et al.* (2007) sugerem que os CPL possam ser atraídos para o timo por quimiocinas produzidas pelo epitélio do timo, como por exemplo Ccl21 e Ccl25. Dado que, ratinhos *nude* não produzem a quimiocina Ccl25, que é normalmente produzida pelo timo fetal, isto pode ser uma explicação para a ausência de colonização do timo por CPL nestes. Além disso, quando o epitélio tímico de ratinhos *Foxn1^{-/-}* começa a produzir Ccl25 há um aumento do número de CPL no timo. Estes dados sugerem que as quimiocinas podem ser importantes no processo de *homing* dos CPL no timo (Liu *et al.*, 2005; Rodewald, 2008).

A segunda e terceira onda de colonização têm origem na medula óssea da galinha e ocorrem aos dias E12 e E18, respectivamente (revisto por Jaffredo *et al.*, 2005b). Os CPL que chegam ao timo a partir da medula óssea, na segunda e terceira onda de colonização, entram no timo através da região cortico-medular (Figura 1.5).

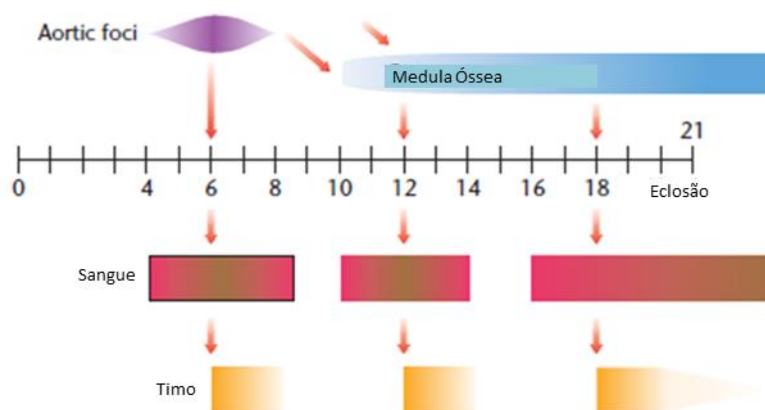


Figura 1.6 Rotas de migração dos CPL da linhagem T. A primeira onda de colonização tem origem nos focos para-aórticos ao dia E6. A segunda e terceira onda de colonização têm origem na medula óssea e ocorrem aos dias E12 e E18 respectivamente. Os estádios de desenvolvimento estão indicados na barra numerada pelo número de dias. Adaptado de Jaffredo *et al.* (2005b).

1.5. Diferenciação das células T:

O timo tem como função principal ser um suporte para a linfopoiese T, ou seja, para a diferenciação das células T (Jotereau e Le Douarin, 1982). Este processo, na galinha, inicia-se ao dia E6 com a colonização do rudimento tímico por CPL que têm origem nos focos para-aórticos. No timo maduro cerca de 95% das células são linfócitos T e estão concentrados na região cortical (Nowell *et al.*, 2007).

Em contraste com o ratinho, os CPL na galinha especificam-se na linhagem T após entrarem no timo (Toivanen *et al.*, 1976). No ratinho adulto, CPL entram no timo pelos vasos sanguíneos presentes na região cortico-medular. Subsequentemente, migram para o córtex onde permanecem e se especificam na linhagem T.

As células T são caracterizadas pela expressão dos TCR (receptores de células T), associada a expressão do co-receptor CD3 e de moléculas acessórias, como CD4 e CD8 - células T *Helper* e citotóxicas, respectivamente. Como nos mamíferos, na galinha, as CPL que chegam ao timo são imaturas e não expressam o co-receptor CD3 nem as moléculas acessórias (CD4 ou CD8), sendo classificadas como células triplas negativas (TN – CD3⁻/CD4⁻/CD8⁻).

Estudos em ratinho demonstraram que as CPL que entram no timo possuem o potencial de se diferenciarem em células B ou células dendríticas (Wu *et al.*, 1991). Pouco tempo depois de entrarem no timo, as CPL perdem esta capacidade e diferenciam-se em células duplas negativas para CD4 e CD8 (CD4⁻/CD8⁻) que expressam CD3. Nos mamíferos, o primeiro estágio de diferenciação dos timócitos é denominado por duplos negativos 1 (DN1), e pode ser identificado através da utilização de anticorpos específicos para estas células, como o CD25 (receptor da interleucina-2, glicoproteína de cadeia simples) e CD44 (glicoproteína de superfície) (Petrie e Zuniga-Pflucker, 2007). O padrão de expressão destas duas glicoproteínas varia ao longo do processo de diferenciação. Nos mamíferos, o aumento ou perda da expressão, respectivamente, do CD25 e CD44 ao longo dos 4 estádios iniciais da diferenciação dos timócitos (DN1, DN2, DN3, DN4), permite a caracterização e identificação

destas subpopulações diferentes que existem no timo. No entanto, este processo não está, ainda, completamente clarificado.

Tal como nos mamíferos, a diferenciação dos timócitos na galinha passa por um primeiro processo de proliferação com o início do rearranjo dos TCR (rearranjo dos loci γ , δ , α e β) (Figura 1.7).

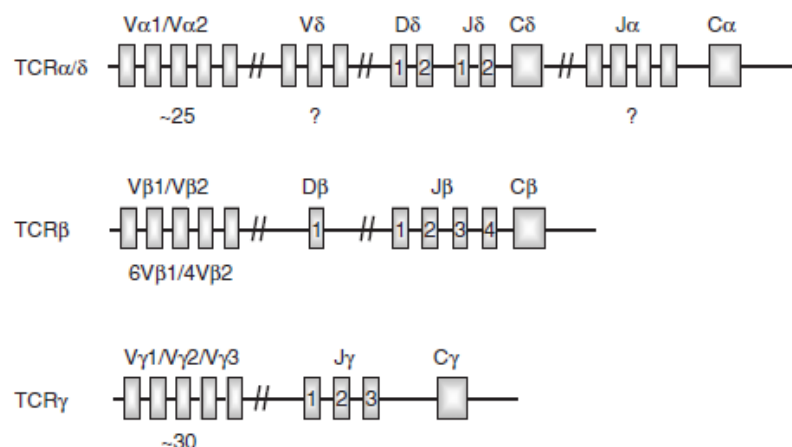


Figura 1.7 - Representação esquemática dos três loci diferentes dos TCR da galinha (loci α/δ (no topo), β (ao meio) e γ (em baixo)). O TCR α contém dois famílias de genes V α com vários elementos, vários elementos J α e um gene C α . O locus TCR δ contém até à data uma família de genes V δ (20 – 30 elementos V δ), dois segmentos de genes D δ , dois segmentos de genes J δ e um gene C δ . O locus TCR β duas famílias de genes V β , 14 segmentos genes D β , 4 segmentos de genes J β e uma gene C β . O locus TCR γ possui três famílias de genes V γ (cada uma com 10 segmentos), três segmentos J γ e um gene C γ . Adaptado a partir de Fred Davison (2008).

Este processo de rearranjo dos TCR é denominado por recombinação VDJ, e consiste no rearranjo dos segmentos dos genes da região *variable* (V) com os segmentos dos genes da região *diversity* (D) e/ou *Joining* (J) (Figura 1.7). Consequentemente, cada timócito possui uma cadeia leve e uma cadeia pesada. A cadeia leve é composta por um α ou γ TCR, que selecciona aleatoriamente um gene V e combina-o com um gene J. Por outro lado, a cadeia pesada é composta por β ou δ TCR, que sofre inicialmente um rearranjo do gene D com o gene J, seguida de uma combinação VDJ. A combinação VDJ consiste na recombinação da cadeia leve com a cadeia pesada.

Este processo forma um antígeno de ligação (receptor heterodimérico) único em cada linfócito T, conferindo uma grande diversidade ao repertório de receptores T. Os TCR α e δ da galinha são codificados por um agrupamento génico designado por TCR α/δ (Kubota *et al.*, 1999; Litman *et al.*, 1999). Neste agrupamento, os genes TCR δ estão localizados entre as sequências V α e J α (Figura 1.6). Devido a este facto, a recombinação do TCR α leva à excisão do *cluster* do TCR δ , sendo que o rearranjo do TCR $\gamma\delta$ acontece sempre 3 dias antes dos TCR $\alpha\beta$ (Figura 1.8).

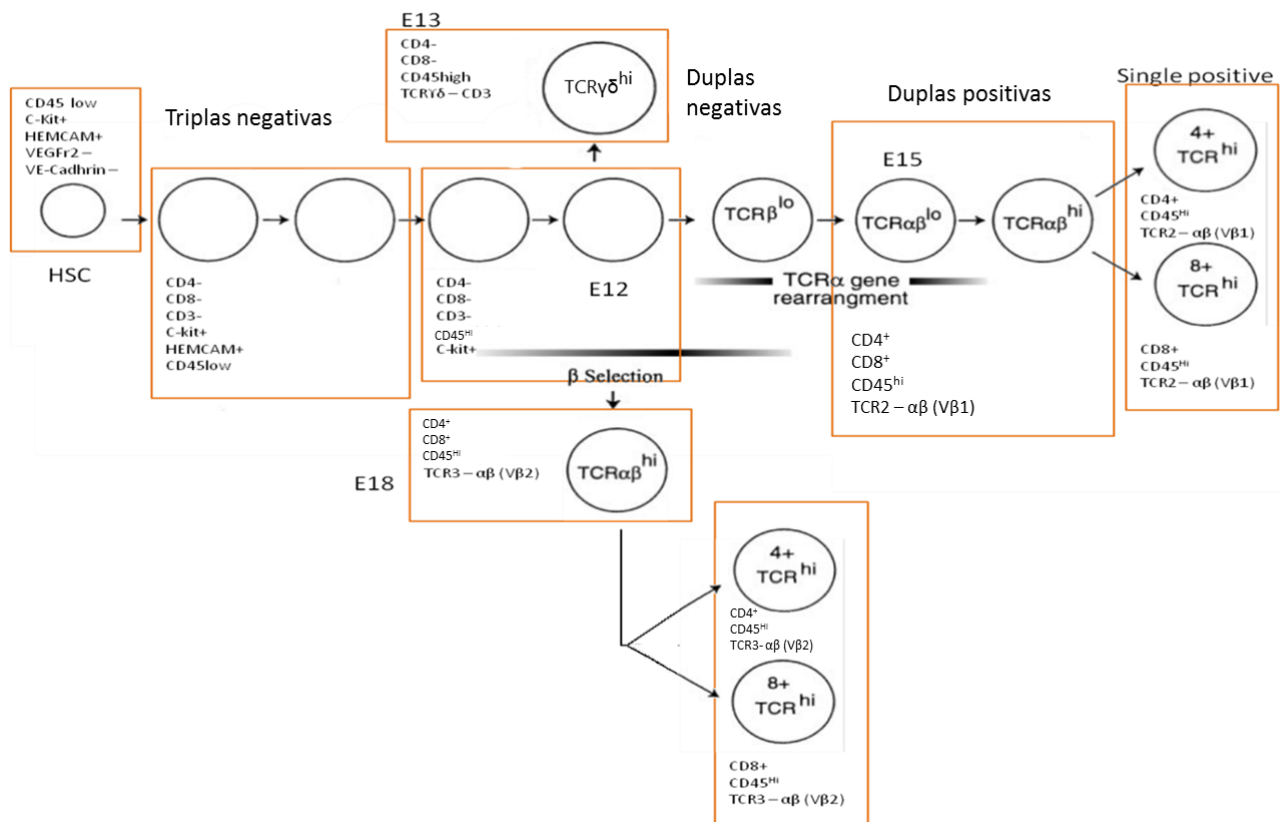


Figura 1.8 Expressão de proteínas específicas de sub- durante o processo de diferenciação na linhagem

T. Na esquerda encontramos as CEH com origem na região dos focos para-aórticos/medula óssea. Estas CEH migram para o timo onde começa o processo de diferenciação e especificação na linhagem T. As células ao entrar no timo são triplas negativas (CD3-/CD4-/CD8-) e começam a rearranjar o receptores TCR (loci γ , δ , α e β). Os primeiros TCR a serem expressos são os TCR1 – $\gamma\delta$ (E13), seguidos dos TCR2 – $\alpha\beta$ (V β 1) ao dia E15 e por fim os TCR3 – $\alpha\beta$ (V β 2) ao dia E18. Adaptado a partir de (Sebzda *et al.*, 1999).

De acordo com Sowder *et al.* (1988) no embrião de galinha, após cada uma das ondas de colonização do timo, uma subpopulação de timócitos começa a expressar o complexo TCR $\delta\gamma$ -CD3 na superfície das células. Estas células são denominadas como TCR1. A primeira subpopulação positiva para o TCR1, aparece no timo a partir do dia E12. Ao dia E15, cerca de 30% da população de timócitos presentes no timo são positivos para o complexo TCR $\delta\gamma$ -CD3. Estes timócitos não são capazes de expressar moléculas acessórias como o CD4 e CD8.

Na galinha, existem mais duas moléculas TCR, TCR2 e TCR3, que são TCR $\alpha\beta$. As células que expressam na sua superfície o TCR $\alpha\beta$ e apresentam a região V β 1 são denominadas por TCR2, surgindo ao dia E15 (Coltey *et al.*, 1987). Esta subpopulação de timócitos torna-se predominante pelo dia E18. Subsequentemente, surge uma subpopulação de células TCR $\alpha\beta$ que apresenta a região V β 2 e que são denominadas por TCR3 ao dia E18.

Os timócitos que expressam TCR2 ou TCR3 passam de duplos negativos CD4⁻/CD8⁻ para duplos positivos CD4⁺/CD8⁺ no córtex do timo (Coltey *et al.*, 1987). Wilson *et al.* (1992). demonstraram que, tal como acontece nos mamíferos, na galinha os timócitos que expressam os

TCR $\alpha\beta$ passam de duplos positivos (CD4⁺/CD8⁺) para *single positives*, onde apenas uma das moléculas acessórias é expressa (CD4⁺/CD8⁻ ou CD4⁻/CD8⁺).

As moléculas TCR são, assim, importantes e altamente sofisticadas no reconhecimento dos antígenos apresentados pelo *self-major histocompatibility complex* (MHC) das células epiteliais. As propriedades que distinguem o reconhecimento dos péptidos realizado pelos TCR dos timócitos, de outros receptores de superfície, são o facto de os TCR serem gerados ao acaso e reconhecerem um grupo de péptidos apresentados pelo complexo MHC das células epiteliais.

Durante o processo de maturação, após o rearranjo dos TCR, os timócitos são submetidos a um processo de selecção β , que leva à expressão das 2 moléculas acessórias na superfície do timócito. Após esta selecção, segue-se o rearranjo do TCR α e a formação do TCR $\alpha\beta$. Posteriormente, os timócitos são, então, submetidos a um processo de selecção no córtex com vista a testar a funcionalidade dos TCR (selecção positiva), seguido de um processo na medula em que se eliminam as células auto-reactivas (selecção negativa). Portanto, numa primeira fase os timócitos, que apresentam na sua superfície a molécula TCR, são capazes de reconhecer os péptidos apresentados pelo complexo MHC das células epiteliais do córtex, sendo positivamente seleccionados (Jameson *et al.*, 1995). Se o TCR não consegue reconhecer os péptidos apresentados pelo complexo MHC das células epiteliais, os timócitos morrem por negligência. Isto acontece devido aos timócitos não receberem os sinais enviados pelas células epiteliais essenciais à sua sobrevivência. Durante o processo de selecção positiva, os timócitos com TCR que reconheceram os péptidos apresentados pelo complexo MHC I vão manter a expressão de CD8 e perder a expressão de CD4, tornando-se *single positives* para CD8 (Jameson *et al.*, 1995) (Figura 1.9). Por outro lado, os timócitos com TCR que reconheceram os péptidos apresentados pelo complexo MHC II vão manter a expressão de CD4 e perder a expressão de CD8, tornando-se apenas positivas para CD4 (Konig *et al.*, 1995) (Figura 1.9).

Após a selecção positiva, os timócitos migram para a medula onde são submetidos a um processo de selecção negativa (Figura 1.9). O processo de selecção negativa tem como função testar a afinidade com que os TCR dos timócitos se ligam aos péptidos do complexo MHC apresentados pelas células epiteliais medulares (Figura 1.9). Se a afinidade da ligação for muito forte e exceder o limiar estas células são marcadas para apoptose (Funk e Palmer, 2003) (Figura 1.9). Este processo mantém, assim, a capacidade de as células do sistema imunitário não atacarem as células do próprio organismo e designado por tolerância central (Abbas *et al.*, 2007).

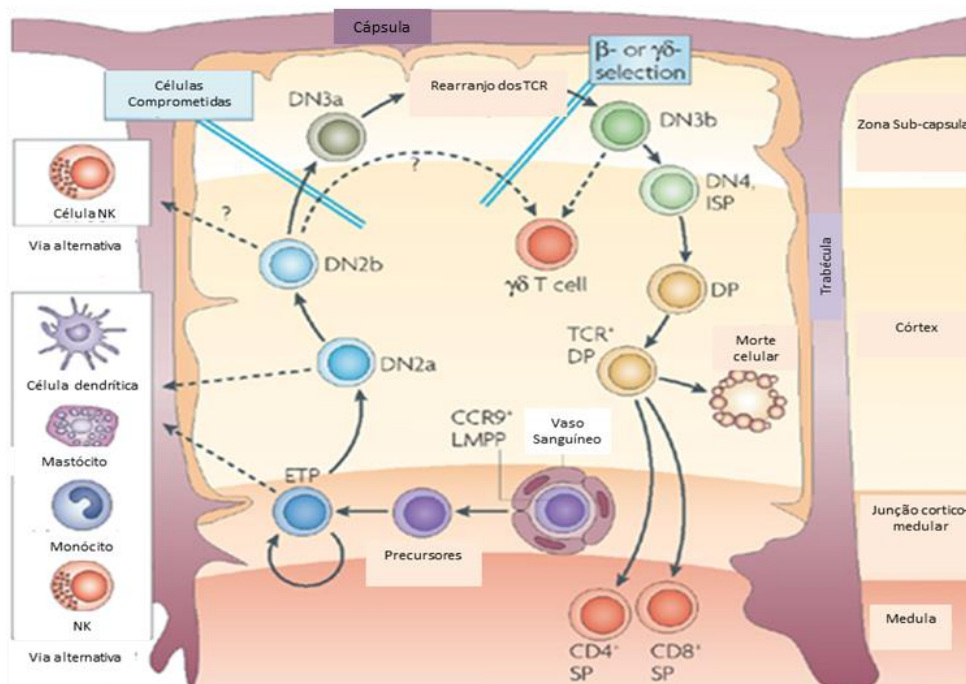


Figura 1.9 Representação de uma secção do timo adulto durante o processo de diferenciação e especificação da linhagem T. Os CPL entram no timo pela região cortico-medular e migram para a região cortical onde de células duplas negativas (para CD4 e CD8) se diferenciam em células duplas positivas (para CD4 e CD8) e entram na região medular como progenitores positivos para CD4 ou CD8. Quando os timócitos estão na fase dupla negativa vão sofrer o rearranjo dos TCR e são submetidos à selecção β , que elimina todas as células que não sejam capazes de rearranjar os TCR. Quando os timócitos se tornam duplos positivos são submetidos a um processo de selecção positiva onde se testa a capacidade dos TCR de reconhecerem os péptidos apresentados pelo complexo MHC das células epiteliais do córtex. As células positivamente seleccionadas entram na medula, tornam-se *single positives* para CD4 ou CD8, e são testadas para aferir se a avidez da ligação TCR-MHC não ultrapassa o limiar. Se este limiar é ultrapassado as células sofrem apoptose. Adaptado de Rothenberg *et al.* (2008)

1.6. Organogénese do Baço:

O baço da galinha é um órgão linfóide que apresenta uma estrutura semelhante ao baço humano (John, 1994), com uma funcionalidade similar ao fígado fetal dos mamíferos. Enquanto nos mamíferos a diferenciação B ocorre na medula óssea, na galinha a diferenciação B ocorre numa primeira fase no baço e numa segunda fase na bursa de Fabricius. A importância do baço na galinha pode ser, ainda, devida ao facto do sistema linfático e dos nódulos linfáticos estarem pouco desenvolvidos (Fred Davison, 2008). O baço é um órgão pouco estudado, apesar de apresentar um papel importante na hematopoiese.

Estudos sugerem que, as CEH colonizam o baço entre o dia E3,5-E5 provenientes da região aórtica (Jaffredo *et al.*, 2005b; Nagy *et al.*, 2005) (Figura 1.10). Após colonizarem o baço, os CEH são submetidos a um processo de rearranjo dos genes Ig por volta do E5, que consiste no rearranjo da cadeia leve e pesada dos genes Ig (Masteller e Thompson, 1994; Masteller *et al.*, 1995a; Kohonen *et al.*, 2007).

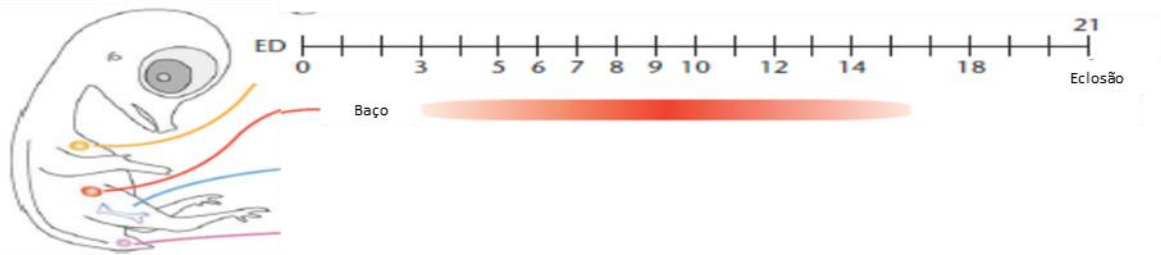


Figura 1.10 Linha temporal do desenvolvimento do baço no embrião de galinha. No topo da figura está a escala em dias de desenvolvimento (ED). Em baixo da escala encontramos a vermelho o tempo de colonização do baço um local definitivo da hematopoiese. Adaptado de Jaffredo *et al.* (2005b)

Em contraste com a bursa e o timo que se desenvolvem a partir da endoderme, o baço é originado a partir de uma camada de células derivadas da mesoderme que se encontra no mesogastrium dorsal. O rudimento do baço emerge às 48h de desenvolvimento, como uma massa de células de mesênquima, entre a parte dorsal do estômago e a face ventral da notocorda (Romanoff, 1960; Fred Davison, 2008). À medida que o baço se desenvolve, uma cápsula exterior de fibras de colagénio vai-se formando no seu exterior. No seu interior, uma rede de sinusóides com eritrócitos começa a formar-se no meio do mesênquima a partir do dia E5. A partir do dia E11 surge uma rede de fibras de colagénio tipo I e III no interior do baço para suporte da estrutura (Yassine *et al.*, 1989).

O baço torna-se um órgão linfóide secundário pelo período de nascimento do embrião, e começa a gerar um microambiente importante para o contacto entre células linfóides e não linfóides. Após o nascimento do embrião, o baço aumenta em tamanho e em peso (Yassine *et al.*, 1989).

No adulto o baço é oval e localiza-se na região esquerda do corpo, e posterior ao estômago. A estrutura básica do baço consiste na polpa vermelha e polpa branca com uma artéria central que se divide em várias arteríolas. Estas arteríolas dividem-se numa fina rede de capilares (Nagy *et al.*, 2005), por sua vez rodeadas por uma camada designada de *Schweigger-Seidel's sheath* ou elipsóide esplénica (Nagy *et al.*, 2005).

1.7. Organogênese da bursa de Fabricius:

A bursa de Fabricius, um divertículo da cloaca, é um órgão unicamente presente nas aves. Nestas, a bursa é um órgão linfóide primário importante para a proliferação e diferenciação dos linfócitos B (Glick, 1991; Masteller *et al.*, 1995a; Michael, 2002). A sua importância foi demonstrada em embriões de galinha, através da remoção da bursa durante o desenvolvimento, verificando-se um bloqueio do desenvolvimento das células B e um repertório de anticorpos limitado (Ratcliffe, 1989; Sayegh *et al.*, 2000; Pike *et al.*, 2004).

No embrião de galinha, a bursa Fabricius é oval (forma de saco) e encontra-se localizada entre a cloaca, na região dorsal, e o sacro, na região ventral (Fred Davison, 2008). A bursa tem origem na ectoderme, da terceira porção da cloaca denominada de *proctodeum*, entre os dias E5-E6 (Romanoff, 1960; Olah *et al.*, 1986; Ribatti *et al.*, 2006; Nagy e Olah, 2010). Tal como outros órgãos em forma de saco, a bursa de Fabricius está envolvida por uma fina camada de músculo liso. Esta camada de músculo é importante para a contração do órgão permitindo, assim, a compressão dos folículos no interior da bursa, promovendo um fluxo de células na medula do folículo e o esvaziamento das *folds* linfáticas da bursa. Pelo dia E8, a bursa começa a ser colonizada por células pré-especificadas na linhagem B provenientes do baço. Estas células migram através do mesênquima até atingirem o epitélio da bursa (Houssaint *et al.*, 1976; Fred Davison, 2008). Quando as células atingem este epitélio, começam a proliferar e forma-se uma estrutura denominada de folículo entre os dias E10-11 (Olah *et al.*, 1986). Estes folículos são constituídos por duas camadas de células o córtex e a medula separadas por uma região cortico-medular (Figura 1.11) (Glick, 1983; Nagy e Olah, 2010).

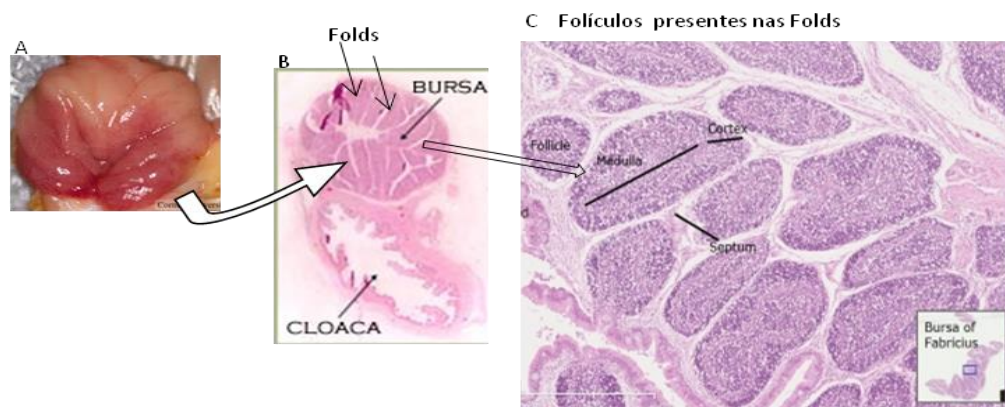


Figura 1.11 Aspecto morfo-histológico da bursa de Fabricius após o nascimento A – Bursa de Fabricius após o nascimento do embrião. B – Corte histológico longitudinal da bursa de Fabricius após o nascimento. C – Corte histológico longitudinal de uma Fold e dos vários folículos presentes na bursa após o nascimento do embrião. É possível ver a diferenciação do epitélio dos folículos em cortes e medula. A – Adaptado de <http://partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas/search/lesion/375>; B – Adaptado de <http://www.upei.ca/~morph/webct/Modules/Lymphoid/bursa.html>; C – Adaptado de <http://www.onlineveterinaryanatomy.net/content/histology-avian-bursa-fabricius>.

Ao dia E15, o epitélio dos folículos inicia o processo de diferenciação (Nagy e Olah, 2010). No entanto, a região do córtex dos folículos só se diferencia totalmente nas semanas após o nascimento (Nagy e Olah, 2010).

Após o nascimento, cada folículo é revestido por uma cápsula rica em colagénio, e alguns capilares que derivam das artérias que se encontram na região da *Fold*, entram no córtex do folículo criando uma rede de capilares na região cortico-medular (Fred Davison, 2008). Estes capilares nunca entram na região medular (Fred Davison, 2008). A região medular dos folículos é composta por células epiteliais e células hematopoiéticas, como células dendríticas e macrófagos (Fred Davison, 2008).

Cerca de 98% dos linfócitos presentes na bursa são células B. A maioria de células B é encontrada no córtex e uma pequena percentagem na medula dos folículos. O número de plasmócitos encontrados na bursa é, também, reduzido sugerindo que poderá existir um bloqueio na fase terminal da diferenciação B (Fred Davison, 2008). A bursa atinge o tamanho máximo às dez semanas após o nascimento, entre as dez semanas e os 7 meses a bursa involui completamente (Ciriaco *et al.*, 2003).

1.8. Diferenciação das células B:

Na galinha, ao contrário dos mamíferos, o processo de diferenciação B ocorre na bursa de Fabricius

A diferenciação B está dividida em três fases: a primeira fase (pré-bursa) ocorre no baço, a segunda fase ocorre na bursa e a terceira fase (pós-bursa) ocorre, por exemplo, na *harderian gland* (Veistinen e Lassila, 2005; Kohonen *et al.*, 2007). Na primeira fase, as células progenitoras B começam a migrar da região da aorta para o baço entre os dias E3,5-E5 (Jaffredo *et al.*, 2005b). Estudos realizados por Houssaint *et al.* (1976) demonstraram que o baço possui células que sofrem o rearranjo dos genes Ig e são capazes de colonizar a bursa. Além disso, estudos mais recentes demonstram que é no baço que os progenitores B são submetidos ao processo de rearranjo dos seus genes Ig (Masteller e Thompson, 1994; Masteller *et al.*, 1995a; Fred Davison, 2008).

O locus da cadeia leve dos genes Ig é constituído por uma *variable region* (V_L), uma região *joining* (J_L) e uma região *constant* (C_L). Por outro lado, o locus da cadeia pesada é constituído por uma região *variable* (V_H), uma região *diversity* (D_H) e uma região *joining* (J_H) (Fred Davison, 2008) (Figura 1.12). O processo de rearranjo dos genes Ig parece ser conservado entre a galinha e os mamíferos. Em ambos, inicia-se com a formação de um complexo recombinase pelos produtos dos genes *RAG1* e *RAG2* (Figura 1.12). Este complexo é responsável pelo reconhecimento e ligação às regiões que flanqueiam os genes que sofrem recombinação. Estas regiões são denominadas por *recombination signal sequences* (RSS). Foi demonstrado por Reynaud *et al.* (1992), que os CPL que expressam os genes *RAG1* e *RAG2* sofrem o rearranjo dos genes Ig. Contudo, ao contrário do que acontece nos mamíferos onde o rearranjo VDJ_H ocorre antes sendo necessário para o rearranjo VJ_L (Benatar *et al.*, 1992), nas aves o rearranjo VDJ_H ocorre ao mesmo tempo que o rearranjo VJ_L

(Kohonen *et al.*, 2007). Assim, a combinação entre a cadeia leve e a cadeia pesada ocorre ao mesmo tempo levando à formação de um receptor IgM (Figure 1.12) (Kohonen *et al.*, 2007).

Nas aves o rearranjo dos genes Ig não é capaz de gerar uma grande variabilidade de anticorpos (Tonegawa, 1983). Esta limitação está relacionada com o facto do locus da cadeia leve possuir apenas um segmento V_L e J_L (Reynaud *et al.*, 1985). Consequentemente, a diversidade obtida pelo rearranjo do locus da cadeia leve é mínima. O mesmo acontece com a cadeia pesada, devido a existência de apenas um gene V_H e J_H (Thompson e Neiman, 1987) (Figura 1.12).

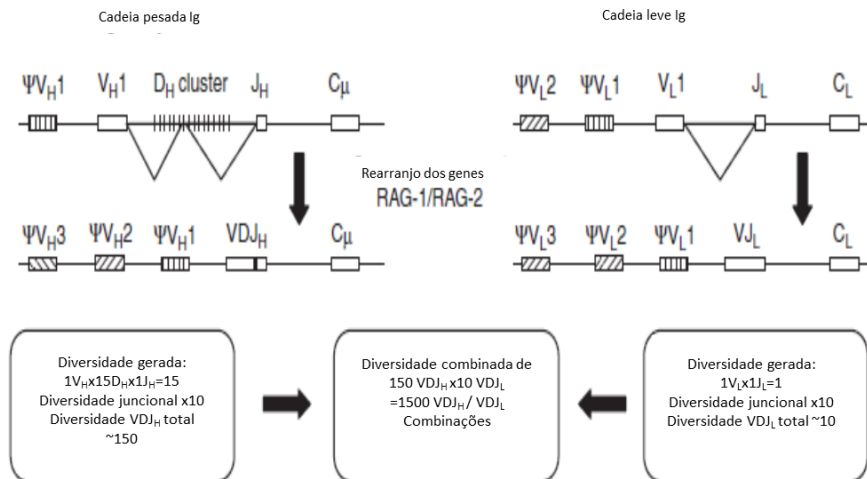


Figura 1.12 Esquema representativo do rearranjo dos genes Ig. A cadeia pesada está representada do lado esquerdo e possui uma região *variable* (V_H), uma *diversity* (D_H) e uma *joining* (J_H). A região D_H possui 15 segmentos de gene ao contrário das regiões V_H e D_H que possui apenas um segmento. A cadeia leve está representada do lado direito e possui uma região *variable* (V_H), uma *joining* (J_H) e uma *constant* (C_L). Todas as regiões possuem apenas um segmento. O rearranjo dos genes Ig ocorre com a ajuda dos genes *RAG1* e *RAG2*. Adaptado a partir de (Fred Davison, 2008).

Por volta do dia E8, uma onda de 10^5 células pré-especificadas na linhagem B, que sofreram rearranjo Ig, migra do baço para a bursa, e termina ao dia E14. Esta onda de colonização é constituída por células positivas para a glicoproteína ChB6 e para o carboidrato sialyl Lewis x (sLex). Estudos demonstraram que o sLex é essencial no processo de entrada destes progenitores na bursa (Masteller *et al.*, 1995a). Ao entrarem na bursa, as células pré-especificadas na linhagem B começam a proliferar e entram no processo de conversão génica (Funk e Palmer, 2003). Assim, para a resolver o problema de baixa variabilidade dos genes Ig, as aves possuem agrupamentos de pseudogenes (3 segmentos) capazes de substituir os genes homólogos V_L ou V_H , genes que sofreram rearranjo anteriormente (Figura 1.13). Um ponto interessante, é que quando o processo de conversão génica se inicia, as células perdem gradualmente a expressão de sLex e começam a expressar Lewis x (Lex) (Masteller *et al.*, 1995b).

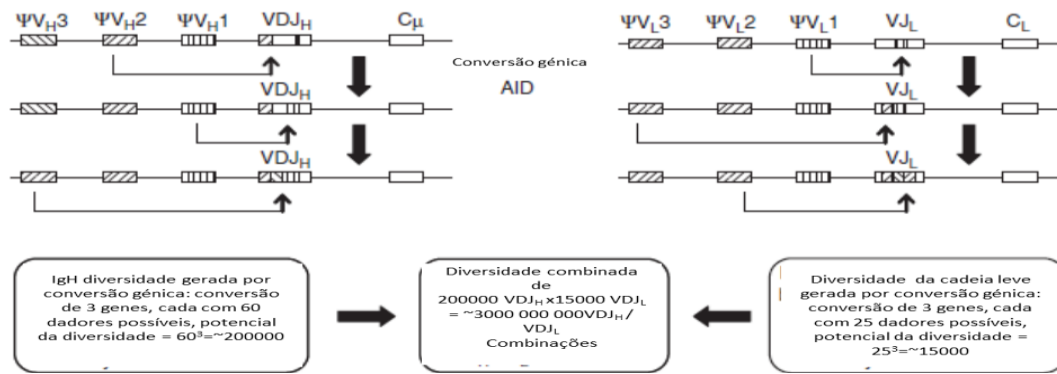


Figura 1.13 Esquema representativo da conversão gênica. À esquerda está representada a região VDJ_H e o agrupamento de pseudogenes, constituído por 3 segmentos ΨV_H (1, 2 e 3). À direita está representada a região VJL e o agrupamento de pseudogenes, constituído por 3 segmentos ΨV_L (1, 2 e 3). A conversão gênica ocorre com a ajuda da enzima AID que cria pequenas lesões no DNA que permitem que o pseudogene seja inserido no agrupamento VDJ ou VJC como processo de reparação. Adaptado a partir de Fred Davison (2008).

Os pseudogenes, de ambas as cadeias leve e pesada, são descritos como as pseudo- V_L (ΨV_L) e V_H (ΨV_H) e estão localizados acima da região V_L e V_H , respectivamente. As sequências ΨV_L não possuem o promotor a 5', sequência *leader* e RSS funcional ou estão truncadas, assim não é capaz de recombinar com o segmento J_L .

O processo de conversão gênica é iniciado através da activação de uma enzima denominada por desaminase de citidina (AID). Estudos realizados por Arakawa *et al.* (2002) revelaram que sem a enzima AID o processo de conversão gênica não ocorre. Estudos demonstraram que a AID cria pequenas lesões na região V da cadeia leve e pesada através da metilação de resíduos de citosina, para formar resíduos uracilo (C-G passa a C-U), para o DNA ser sujeito a um processo de reparação (Bransteitter *et al.*, 2003; Dickerson *et al.*, 2003; Larijani *et al.*, 2005). Este processo de reparação é um mecanismo que envolve o uso da região homóloga dos pseudogenes como modelo para a reparação do erro (Figura 1.14) (Ratcliffe, 2006).

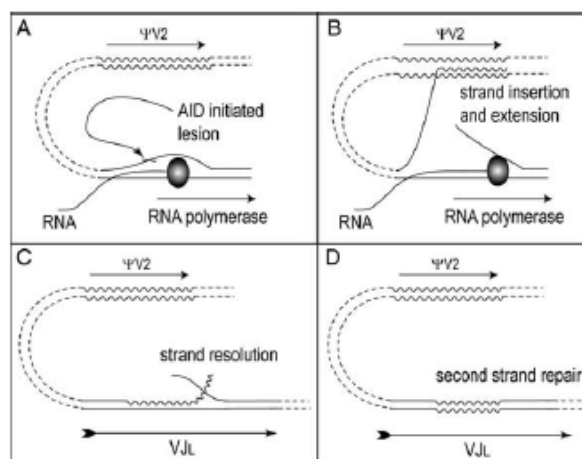


Figura 1.14 Esquema representativo do processo de conversão gênica. A – A enzima AID cria uma lesão no DNA através da metilação de uma citosina. B – Existe um deslocamento da cadeia de DNA para um pseudogene devido da homologia das sequências. C – A cadeia de DNA foi reparada e volta a posição inicial na região V_L . D – A cadeia reparada serve como modelo para a cadeia não reparada. Adaptado de Ratcliffe (2006).

O processo de conversão génica pode durar até 16 semanas após o nascimento. Apenas 5% das células que sofrem conversão génica sobrevivem e migram para fora da bursa poucos dias antes do nascimento, para os centros germinais do baço e *Harderian gland*, onde vão terminar o seu processo de diferenciação (Paramithiotis *et al.*, 1995; Veistinen e Lassila, 2005). Ao saírem da bursa, as células B maduras sofrem um processo de hipermutação, processo este que também está presente nos mamíferos, quando recebem estímulos externos (resposta imunitária adaptativa) (Kohonen *et al.*, 2007). O processo de hipermutação é mediado pela enzima AID e tem como função aumentar o repertório de anticorpos das aves e mamíferos.

1.9. Sinalização Notch:

A sinalização Notch é uma via de sinalização célula a célula muito importante e altamente conservada no reino animal. Tem um papel preponderante no desenvolvimento do embrião, nomeadamente na neurogénese, e regula alguns processos de diferenciação celular no adulto como a diferenciação T (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995).

Em 1917, o geneticista Thomas Hunt Morgan e colaboradores descreveram o gene *Notch* após a observação de recortes (*notches*) nas asas da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Morgan, 1917). Este fenótipo era devido a uma perda de função do gene *Notch* (Wharton *et al.*, 1985). Donald Poulson caracterizou o primeiro mutante *Notch* em *Drosophila* e concluiu que a via de sinalização Notch era essencial para o desenvolvimento neuronal (Poulson, 1937; Poulson, 1945; Lehmann *et al.*, 1983). Durante os seus estudos, Poulson também notou que estes mutantes *Notch* apresentavam defeitos no desenvolvimento de outros tecidos. Ficou, então, claro que a via sinalização Notch não era só importante no desenvolvimento neuronal mas também era importante para o desenvolvimento de outros órgãos, como por exemplo, o desenvolvimento do rim, miogénese e caridogénese, e para a diferenciação de vários tipos de células, por exemplo, diferenciação de células hematopoiéticas (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Jaleco *et al.*, 2001; Lai, 2004; Neves *et al.*, 2006). Portanto, defeitos na via de sinalização Notch são responsáveis pelo aparecimento de algumas patologias no ser humano, incluindo leucemia das células T e doenças cardíacas (Ellisen *et al.*, 1991; Garg *et al.*, 2005).

Nos mamíferos, a sinalização Notch é constituída por 4 receptores transmembranares (Notch 1-4) e 5 ligandos que se encontram divididos em duas famílias diferentes (Delta (DI) – 1, 3 e 4; Jagged (Jg) 1-2) (Bray, 2006). Em contraste, nas aves só existem dois receptores *Notch*, Notch1 e Notch2, e 5 ligandos, DI -1, DI-3 e DI-4, Serrate 1 e Serrate2 (homólogos do Jagged nos mamíferos) (Henrique *et al.*, 1995; Vargesson *et al.*, 1998; Morimura, 2001). Os receptores *Notch*, proteínas transmembranares do tipo-1, acumulam-se no citoplasma das células após serem sintetizados. Estes receptores são proteoliticamente clivados no complexo de Golgi por uma *Furine-like protease* que reconhece uma sequência de aminoácidos específica denominada de S1 (Figura 1.15). Após esta clivagem, os receptores são incorporados na parede celular das células. A via de sinalização Notch é

activada quando os receptores *Notch* na parede celular de uma célula interagem com um ligando *Notch* expresso por uma célula vizinha. Esta interacção entre ligando-receptor, leva a que o receptor *Notch* seja clivado no domínio extracelular (NECD) no local S2 por uma metaloprotease da família ADAM (Anderson e Jenkinson, 2001; Zolkiewska, 2008). Subsequentemente, ocorre outra clivagem proteolítica no domínio transmembranar no local S3 do receptor *Notch* mediado por um complexo γ -secretase (Schweisguth, 2004) (Figura 1.15). Esta clivagem tem como objectivo libertar o domínio intracelular do receptor *Notch* (NICD) para o citoplasma que migra para o núcleo e heterodimeriza com o factor de transcrição CSL (CBF-1 em humanos, Supressor de hairless (SuH) na *Drosophila*, Lag-1 em *C. elegans* e RBP-J no ratinho) (Bray, 2006; Gordon *et al.*, 2008) (Figura 1.15). Estudos realizados por Ong *et al.* (2006) demonstraram que quando o NICD não está presente, o factor de transcrição CSL forma um complexo repressor nos genes alvo do complexo CSL/NICD. Após a formação do complexo CSL-NICD, outros co-activadores são recrutados para formarem o complexo de activação da transcrição, como por exemplo a *Mastermind* (MAML1) (Mumm e Kopan, 2000; Wu *et al.*, 2000). O complexo CSL/NICD/MAML1 desencadeia o processo de transcrição dos genes alvos da sinalização Notch, como por exemplo *Hairy enhancer of split* (*Hes*) e *Hairy related* (*Hey* ou *Hrt* – genes homólogos de *Hes* em *Drosophila*) (Palomero *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2006) (Figura 1.15). Estes genes alvo da sinalização Notch têm sido amplamente estudados e caracterizados, tendo sido demonstrado que intervêm na somitogénese, na segmentação dos membros, na neurogénese e hematopoiese (Pascoal *et al.*, 2007; Brend e Holley, 2009; Lewis *et al.*, 2009; Guiu *et al.*, 2013).

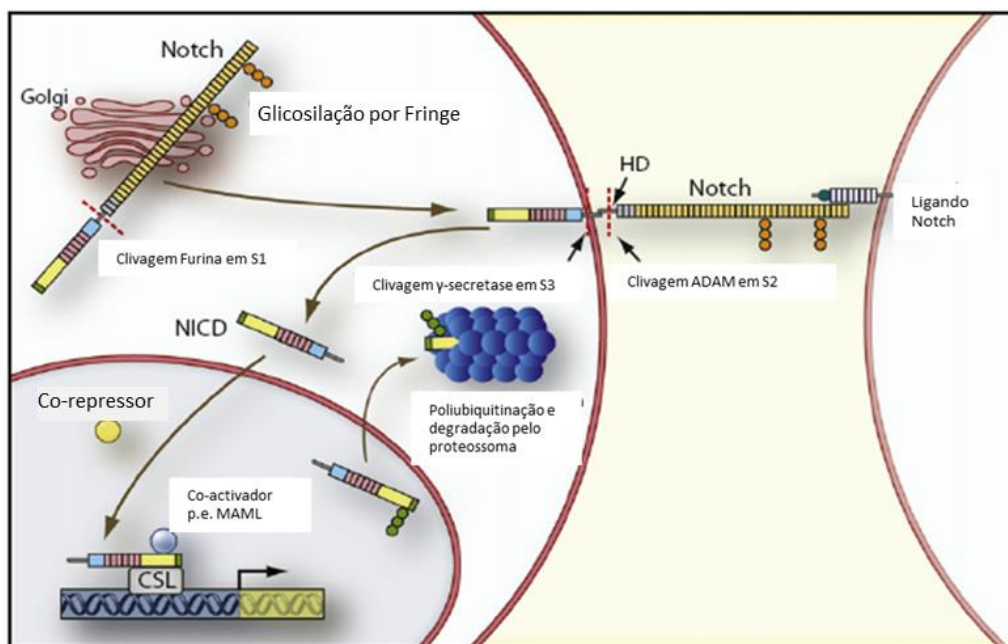


Figura 1.15 Via de sinalização Notch. A via de sinalização inicia-se através da interacção célula a célula. O receptor (Notch 1 ou 2) e um ligando (DI - 1,3 ou 4 / Serrate 1 ou 2) de células vizinhas interagem induzindo uma clivagem no domínio extracelular do receptor (NECD) (local S2) por uma metaloprotease da família ADAM. De seguida o receptor volta a ser clivado proteoliticamente no domínio transmembranar (local S3) por uma γ -secretase. Esta clivagem proteolítica vai originar a libertação do domínio intracelular do receptor (NICD) para o citoplasma. O NICD vai migrar para o núcleo onde se vai juntar ao factor de transcrição CSL. Juntos vão recrutar outros co-activadores, como a proteína MAML1 para formarem o complexo de activação da transcrição. Com a formação deste complexo a transcrição dos genes alvo da sinalização Notch é activada. Adaptado a partir de (Radtke *et al.*, 2010).

Estudos conduzidos por Neves e colaboradores sugerem que a sinalização Notch pode ter um papel importante na organogénese do timo. Nestes estudos, foi observado que genes relacionados com a sinalização Notch (receptores, ligandos e genes alvo) são expressos no domínio prospectivo do timo e no mesênquima circundante. Em particular, a expressão de *Hes1* foi identificada na endoderme da 3ª e 4ª BF nos dias E3 e E4. Estes dados sugerem que a sinalização Notch está activa no território prospectivo do timo. Estudos recentes em galinha revelam, ainda, que a inibição da sinalização Notch na região faríngea leva a uma redução da expressão de *Gcm2*, enquanto a expressão de *Foxn1* é afectada aleatoriamente (Figueiredo, 2011). Estudos realizados por L. Parreira e colaboradores mostraram que no timo de ratinho, a via de sinalização Notch é importante para a hematopoiese, nomeadamente na diferenciação T (Parreira *et al.*, 2003). Estes estudos demonstram que os genes *Notch* são expressos diferencialmente nos microambientes do timo, sendo importantes no processo de especificação dos CPL na linhagem T (Parreira *et al.*, 2003). Além disso, quando *Notch1* é eliminado a diferenciação T é bloqueada e o número de células B presentes no timo aumenta (Radtke *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000). Por outro lado, o aumento de expressão de *Notch1* induz o aparecimento ectópico de células duplas positivas para CD4 e CD8 (Pui *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que *Notch1* induz os CPL a adoptarem o destino de célula T (Wilson *et al.*, 2001). Apesar de *Notch1* parecer ser o receptor mais envolvido na diferenciação T e na maturação tímica, os ligando responsáveis pela sua activação não estão completamente esclarecidos. Alguns estudos revelam que, com a excepção de DI3, todos os ligandos *Notch* são expressos nos microambientes tímicos (Felli *et al.*, 1999; Parreira *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2004; Hozumi *et al.*, 2008). Estudos realizados por Jaleco e colaboradores demonstraram que quando os progenitores hematopoiéticos isolados de sangue de cordão umbilical são co-cultivados sobre uma monocamada de células a expressar DI1 ou DI4 existe um bloqueio da diferenciação em linfócitos B e um favorecimento da diferenciação em linfócitos T (Jaleco *et al.*, 2001). Outros estudos realizados em ratinho revelaram que os ligandos Jagged1 e Jagged2 actuam através da manutenção dos progenitores hematopoiéticos que chegam ao timo (Varnum-Finney *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 2000). Contudo, estudos mais recentes realizados por Mancini *et al.* (2005) demonstraram que ratinhos mutantes para Jagged1^{-/-} e ratinhos mutantes para Jagged2^{-/-} apresentavam o processo de diferenciação T normal. Estas descobertas excluem os ligandos Jagged de terem um processo importante na diferenciação T.

1.10. Objectivos:

Os principais objectivos deste trabalho foram: 1) estudar a organogénese do timo e baço em embriões de galinha; 2) caracterizar fenotipicamente as células presentes em ambos os órgãos em estádios específicos do desenvolvimento embrionário; 3) estudar o papel da sinalização Notch na diferenciação dos progenitores hematopoiéticos isolados do timo e do baço do embrião da galinha.

Para estudar o desenvolvimento do timo e do baço, os rudimentos de ambos os órgãos foram isolados de embriões de galinha entre os dias E8 e E14. Posteriormente, os órgãos foram fixados e embebidos em parafina. Fizeram-se cortes seriados que depois foram corados com Hematoxilina e eosina – HE) ou utilizados para imunohistoquímica (com o anticorpo HNK1). A caracterização morfológica de células presentes nestes órgãos foi realizada pela análise dos respectivos *citospins* corados com HE

A caracterização fenotípica de diferentes populações de progenitores hematopoiéticos que colonizam o baço e o timo foi feita por citometria de fluxo após o isolamento das células em tempos específicos do desenvolvimento (E10 – baço e E13 e E15 – timo).

Realizamos também ensaios de co-cultura para compreender o papel da sinalização Notch na diferenciação dos progenitores hematopoiéticos (isolados do baço e timo) em células T. Para isso, utilizámos um sistema experimental *in vitro*, onde os progenitores hematopoiéticos foram co-cultivados sobre uma monocamada de células estromais de medula óssea de ratinho (OP9 ou S17) manipuladas geneticamente de modo a expressarem diferentes ligandos da sinalização Notch (DI1 e DI4).

Com este trabalho esperamos contribuir para o conhecimento científico da área e compreender melhor os fenómenos associados.

Capítulo 2: Métodos

2. Métodos:

2.1 Manipulação dos embriões de galinha:

Os ovos de galinha fertilizados foram obtidos da Sociedade Agrícola Quinta da Freiria, S.A., Portugal, armazenados a 16°C e posteriormente incubados a 37,5°C numa incubadora humidificada. Os estádios de desenvolvimento foram estimados pela duração do tempo de incubação e de acordo com estudos já realizados por Hamburger e Hamilton (1951). Foram isolados diferentes regiões hematopoéticas (região do pescoço do embrião que contém os agrupamentos intra-aórticos, focos para-aórticos) e diferentes órgãos (bursa de *Fabricsius*, baço, timo) do embrião de galinha em estádios de desenvolvimento específicos. Os órgãos isolados foram incluídos em parafina para serem seccionados (Intra-aórticos, focos para-aórticos, baço, timo) ou macerados para obter suspensões celulares necessárias para realizar *citospins*, imunomarcações ou experiências de co-cultura (baço, timo).

2.2 Citospins:

Os timos e baços foram isolados numa câmara de fluxo laminar horizontal. Após serem isolados, foram colocados em tubos separados com uma solução composta por PBS 1x (CaCl₂, MgCl₂ free) (GICBO), 1% PenStrep (GICBO) e 1% FBS (GICBO). As células do baço e os timócitos foram isolados de pelo menos 5 embriões em cada tempo experimental (E6 – E14). Numa câmara de fluxo laminar vertical, os baços e timos foram macerados com a ajuda de um filtro com uma malha de 70µm para obter uma suspensão de células individualizadas. As células foram contadas através da utilização de um hemacitómetro de Neubauer's. Para cada *citospin* foram pipetados 100µl da suspensão celular (concentração celular é de 1x10⁶ cel/ml) para o funil de plástico adaptado à lâmina do *citospin* (Figura 2.1) Todas as amostras foram centrifugadas a 500rpm durante 5 minutos numa centrífuga própria (Figura 2.1).

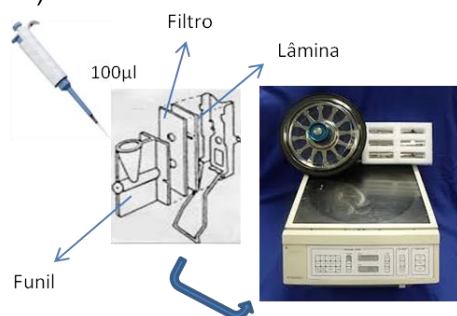


Figura 2.1 Representação do processo experimental para obter um *citospin*. As amostras são colocadas no funil que se encontra preso ao filtro e à lâmina do *citospin*. O funil é colocado na centrífuga (Cytospin 2 - Shandon). Durante a centrifugação as células (presentes no funil) são projectadas contra a lâmina originando um círculo de células na lâmina. Adaptado de http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1385_1-59259-151-5_31-1

Para cada tempo experimental foram realizadas e armazenadas pelo menos 22 lâminas de *citospin* com células isoladas de baços e de timos. Destas 22 lâminas, 10 foram directamente

guardas em metanol e depois colocadas a -80°C. Outras 10 lâminas foram fixadas com 3,7% PFA em 1%PBS durante 10 minutos e depois foram colocadas em etanol 70% a -20°C. As restantes lâminas foram colocadas em etanol a 50% ou a 95% e posteriormente coradas com hematoxilina-eosina.

2.3 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE) – A coloração dos *citospins* foi realizada com hematoxilina de Harris (Merck Millipore) e eosina Y alcoólica (Thermo Scientific) de acordo com instruções específicas do fabricante:

1. Hidratar as lâminas:
 - Álcool a 100% – 5min.
 - Álcool a 95% – 5min.
 - Álcool a 70% – 5min.
 - Água destilada – 5min.
2. Hematoxilina de Harris – 10min.
3. ddH₂O – imergir 1x
4. Clorídrico álcool 1% – imergir 3x
5. Água da torneira (morna) – 5 min.
6. Álcool a 70% – imergir 1x
7. Eosina alcoólica – imergir 4x
8. Álcool a 70% – 30 seg.
9. Álcool a 95% – 30 seg.
10. Álcool a 100% – 30 seg.
11. Xilol → 10 min
12. Montar com enttalan

2.4. Captação de imagem (Axiovert 200M) – Após serem corados com HE, os *citospins* foram digitalizados com uma ampliação de 40x no sistema axiovert 200M. O axiovert 200M é um microscópio invertido fluorescente de campo largo que pode ser equipado com uma câmara a cores (Leica 490M). Várias fotos sequenciais foram tiradas utilizando o *software* Metamorph. Posteriormente, estas fotos sequenciais foram fundidas formando uma única imagem fotocomposta (a percentagem de fotocomposição varia entre 40% e 50%) neste mesmo *software*. Em cada *citospin* foram contadas as células de nove campos diferentes com 400mm de área no Photoshop CS6.

2.5. Secções dos órgãos isolados:

Secções em parafina – Os embriões foram dissecados em tempos de desenvolvimento específicos e os seus órgãos foram isolados. Estes órgãos foram fixados com 3,7% PFA em PBS1 x durante a noite a 4°C. Foram posteriormente processados e incluídos em parafina. As secções foram obtidas num micrótomo manual (Leica RM2235), os órgãos foram cortados em séries de 3 cortes por lâmina com aproximadamente 5 a 7µm de espessura.

2.6. Imunohistoquímica (IHC) em secções de parafina – A detecção da expressão proteica em secções de parafina foi realizada segundo o protocolo descrito em Neves *et al.* (2012), e otimizada para cada anticorpo:

Dia 1:

1. Desparafinar as lâminas em xilol durante 15min.
2. Hidratar as lâminas:
 - Álcool a 100% – 5min
 - Álcool a 95% – 5min
 - Álcool a 70% – 5min
 - Água destilada – 5min
3. Lavar as lâminas em PBS 1x – 5min (com agitação)
4. Bloquear a peroxidase endógena:
 - Aplicar 300µl de H₂O₂ por lâmina
 - Incubar durante 20min à temperatura ambiente numa câmara húmida.
5. Lavar as lâminas em PBS 1x – 5min cada – 3x (com agitação)
6. Uma por uma, imergir as lâminas em PBT (PBS 1x/0,1% de tween20)
 - Aplicar 100µl do anticorpo primário (uma gota por cada secção) – hnk1 sobrenadante concentrado – cuidadosamente para evitar a formação de bolhas, cobrir a preparação com uma lamela.
 - Incubar durante a noite a temperatura ambiente numa câmara húmida.

Dia 2:

7. Lavar as lâminas durante 2min. em PBS 1x (com agitação) para permitir a remoção da lamela.
8. Lavar as lâminas em PBS 1x – 3x 5min. (com)
9. Uma por uma, imergir as lâminas em PBT (PBS 1x/0,1%tween20)
 - Aplicar 100µl de anticorpo secundário – rat anti-mouse Igm – hrp 1:100 (southernbiotech 11140-05) – cuidadosamente para evitar a formação de bolhas, colocar uma lamela.
 - Incubar durante 2h à temperatura ambiente numa câmara húmida.
10. Lavar as lâminas durante 2 min em PBS 1x (com agitação) para permitir a remoção da lamella
11. Lavar as lâminas em PBS 1x – 3x 5min
12. Revelar o sinal com Kit de DAB (Diaminobenzidine) – Sol. A (Sigma D-6190) + Sol. B (Sigma D6065) – Misturar 1 gota de Sol. B com 1ml de Sol. A.
13. Aplicar 250-500µl da solução DAB, cobrir as secções com uma lamela, e colocar a revelar numa câmara escura e húmida.
14. Lavar as lâminas em água destilada – 3x 5min
15. Corar com hematoxilina Gill's II de – Leica 3801522EP 1:2 em água destilada.

- Uma a uma mergulhar as lâminas 3 vezes na hematoxilina, de seguida uma passar as lâminas num recipiente com água da torneira, de seguida passar as lâminas por 2 recipiente com água destilada.

16. Desidratar as lâminas:

- Álcool a 70% – 5min.
- Álcool a 95% – 5min.
- Álcool a 100% – 5min.

17. Clarificar as lâminas em Xilol por 15min e montar com enttalan

O anticorpo contra os antigénios HNK1 (*Human Natural killer 1*) foi utilizado para detectar células da crista neural em migração. HNK1 é uma molécula adesiva com um carbohidrato como epíteto que contém um resíduo *sulfoglucuronyl*. As fotografias foram tiradas com recurso de um microscópio Brightfield Leica DM2500, equipado com uma câmara (Leica 490M) para *brighfield* e *differential interference contrast imaging*. As fotografias foram tiradas com diferentes objectivas (da objectiva de 5x até objectiva de 40x). As fotografias foram colocadas à escala (µm) com a ajuda do programa ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/).

2.7. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE) – A coloração de HE das secções em parafina foi feita utilizando a hematoxilina de Harris (Merck Millipore) e eosina Y alcoólica (Thermo scientific) de acordo com as especificações dos fabricantes.

Captação de imagem: As fotografias foram tiradas com recurso de um microscópio Brightfield Leica DM2500, equipado com uma câmara (Leica 420M). As fotografias foram tiradas com diferentes objectivas (da objectiva de 5x até objectiva de 40x). As fotografias foram colocadas à escala (µm) com a ajuda do *software* ImageJ (rsb.info.nih.gov/ij/).

2.8. Ensaios de Co-cultura:

2.8.1. Isolamento de progenitores hematopoiéticos de timo e baço:

Os órgãos isolados (baço e o timo) foram colocados numa solução constituída por PBS 1x (isento de CaCl₂, MgCl₂) (GICBO), 1% PenStrep (GICBO) e 1% FBS (GICBO). Os progenitores hematopoiéticos foram extraídos de pelo menos 20 embriões por cada estágio de desenvolvimento em estudo. Numa câmara de fluxo laminar vertical os órgãos isolados foram macerados mecanicamente com a ajuda de um filtro de *nylon* com malha de 70µm. Após a maceração dos timos, as células mononucleadas foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque (Ficoll - Paque PLUS GE Healthcare Life Sciences) (Figura 2.2 – B). As suspensões células obtidas a partir da maceração dos baços não foram purificadas através de gradiente Ficoll-Paque para evitar a perda de células importantes ao estudo. As células obtidas de cada órgão foram depois contadas numa câmara de Neubauer (Figura 2.2 – C).

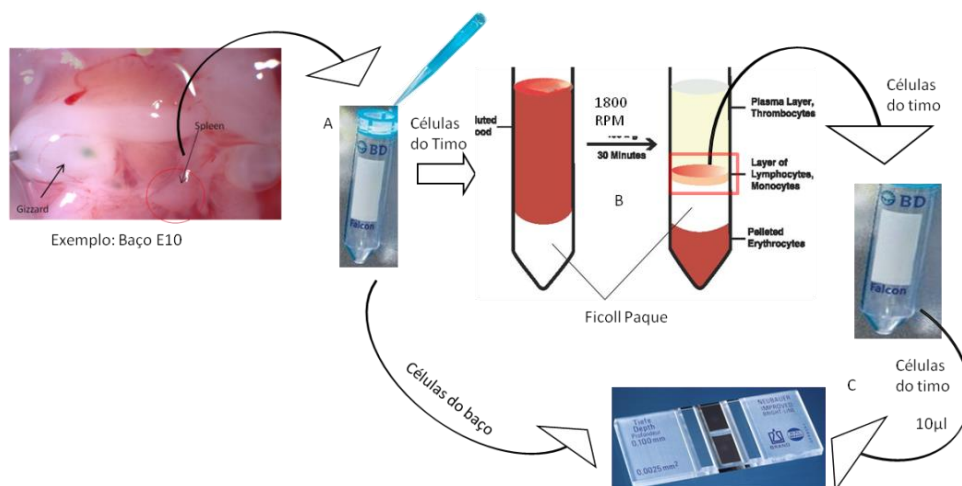


Figura 2.2 – Representação esquemática do procedimento experimental de obtenção de PH de timos E13 e E15 e de baços E10. A – Os timos e baços foram mecanicamente macerados através da utilização de um filtro de *nylon* com 70µm de poro. As células do baço foram directamente para o hemacitômetro; B – A suspensão celular de timos foi purificada através do uso de um gradiente de Ficoll-Paque (Ficoll- Paque Plus GE Healthcare Life Sciences®), esta separação permite separar as células de interesse das restantes células, como eritrócitos ou células mortas. C – As células de timos e baço foram contadas numa câmara de Neubauer. Adaptado <http://www.himedia.cz/produkty/lymfo>

2.8.2. Manutenção de linhas celulares S17 e OP9 derivadas de ratinho:

A linha de células estromais de medula óssea S17 (cedida por D. Rawlings, UCLA, Los Angeles, CA) foi utilizada como uma monocamada celular onde foram co-cultivados os progenitores hematopoiéticos extraídos dos órgãos macerados, como descrito por Rawlings *et al.* (1995).

Foram utilizadas 3 linhas celulares estromais S17 diferentes: uma linha S17 parental controlo (*Wild Type* - WT) e duas linhas S17 transduzidas com os ligandos da sinalização Notch, *Delta-1* e *Delta-4* (Jaleco *et al.* 2001). Foram também utilizadas 4 linhas células estromais OP9 diferentes: uma linha OP9 parental um controlo (OP9-WT) e três linhas OP9 transduzidas com vector vazio (OP9-Ø) ou contendo os ligandos da sinalização Notch, DI1 (OP9-DL1) e DI4 (OP9-DL4).

As alíquotas de células S17/OP9 encontravam em azoto líquido a -180°C. As alíquotas foram descongeladas e as células foram ressuspensas em meio de cultura (este meio é composto por RPMI1604 (Sigma®), 10% FBS, 1% Glutamax, 1% PenStrep (Invitrogen®)) e centrifugadas para retirar todo o meio e DMSO presente na solução de congelação. As células foram posteriormente ressuspensas em meio de cultura, semeadas em frascos T75 (Nunc®) e colocadas a 37°C numa atmosfera húmida que contém 95% de oxigénio e 5% de CO₂ (Heraeus® HERAccl®) (Jaleco *et al.*, 2001). O meio de cultura foi trocado de dois em dois dias.

2.8.3. Co-culturas de progenitores hematopoiéticos e linhas estromais:

No dia anterior ao início da co-cultura, as linhas estromais foram semeadas em monocamadas em placas de 24 poços e colocadas a 37°C numa atmosfera húmida que contém 95% de humidade e 5% de CO₂ (Heraeus® HERAcell®) (Figura 2.3) (as células OP9 foram irradiadas antes de serem semeadas para bloquear o seu ciclo celular) (Jaleco *et al.*, 2001). No dia seguinte as células S17/OP9 apresentavam-se bem distribuídas. Os progenitores hematopoiéticos obtidos a partir dos embriões dissecados foram colocados nas placas de 24 poços por cima da monocamada de células S17/OP9. As co-culturas foram colocadas a 37°C numa atmosfera húmida que contém 95% de humidade e 5% de CO₂. Metade do meio de cultura (RPMI 1640, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamax) presente em cada poço foi substituído todos os dias por igual volume de meio fresco.

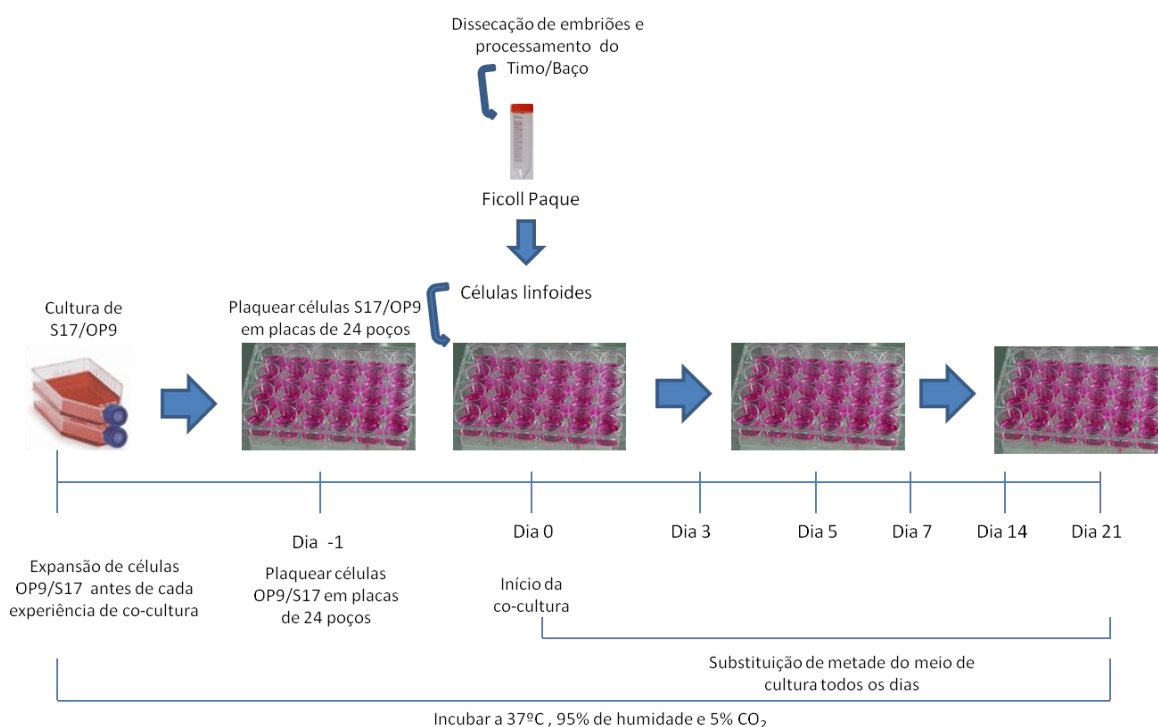


Figura 2.3. Co-cultura de PH com células estromais S17/OP9. As células isoladas do timo ou do baço foram semeadas sobre a monocamada de células estromais e colocadas na incubadora a 37°C com 95% de humidade 5% CO₂ durante (3, 5, 7 e 14 dias). Após o período de co-cultura as células foram recolhidas e marcadas com anticorpos para citometria.

2.8.4. Citometria de fluxo:

Aos dias 3, 5, 7 e 14 de co-culturas, as células em suspensão foram recolhidas para análise fenotípica por citometria de fluxo. As células recolhidas foram contadas num hemacitómetro pois amostra a analisar deve apresentar uma concentração celular entre $7,5 \times 10^4$ e 1×10^5 células/ml. As amostras foram imuno-marcadas anticorpos monoclonais (mAbs) durante 30 minutos, a 4°C, no escuro, e posteriormente a lavadas com PBA (1%PBS suplementado por 0,5% BSA (MERCK) e 0,5µM EDTA) para retirar todo o anticorpo em excesso da amostra. Devido a alguns anticorpos não estarem directamente ligados a moléculas fluorescentes que permitem a sua detecção por citometria de fluxo, uma segunda marcação é necessária para a sua detecção. Neste segundo passo, são colocados 100µl o anticorpo secundário em cada amostra a 4°C, no escuro. Após o período de incubação, a amostra é lavada com PBA para retirar todo o anticorpo em excesso da amostra. Após a marcação as amostras são analisadas por citometria de fluxo utilizando a LSRFortessa™ (BD Bioscience) com o *software* Diva (BD Bioscience).

Para cada condição estudada e analisada por citometria de fluxo foram adquiridos um número mínimo de eventos (5×10^4 eventos) para posterior análise com a ajuda do *software* FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR). O passo inicial da análise foi estudar o fenótipo das células recolhidas nos diferentes tempos experimentais através da análise dos parâmetros *Forward scatter* (Tamanho das células analisadas) e *Side Scatter* (a complexidade celular – Quanto mais grânulos uma célula possui mais complexa é). Através da análise fenotípica foram identificadas diferentes subpopulações celulares. Após a selecção das populações foram estabelecidos parâmetros de positividade e negatividade para cada marcador através da comparação de uma amostra sem marcação (controlo) e as diferentes marcações utilizadas. As proporções de células positivas MM, Bu1a, CD4 e CD8 foram recolhidas como percentagem ou números absolutos.

2.8.5. Marcação com os diferentes anticorpos:

Os anticorpos anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-MM estavam acoplados a moléculas fluorescentes por outro lado os anticorpos anti-Bu1a biotina e anti-CD4 de galinha tiveram de ser reconhecidos por outros anticorpos secundários marcados com moléculas de fluorescência. Todos os anticorpos primários utilizados foram adquiridos da Southern Biotech (Tabela 1):

Protocolo para imunofluorescência directa:

Recolher as células dos poços de co-cultura e colocar 1×10^5 células para cada marcação a realizar

1. Centrifugar as células durante 7min a 1700rpm
2. Aplicar 100µl de anticorpo – marcado directamente – e ressuspender muito bem a amostra
3. Incubar a 4°C no escuro durante 30min
4. Aplicar 100µl de tampão MACS Buffer (0,5%/BSA, PBS 1x /0,5µM EDTA) para lavar o anticorpo em excesso

5. Centrifugar as células durante 7min a 1700rpm
6. Remover o sobrenadante e repetir o processo de lavagem mais duas vezes com tampão MACS
7. Ressuspender as células em 150µl de tampão MACS e passar para tubos de citometria de fluxo

Nos casos em que os anticorpos não se encontravam marcados directamente com fluorescência foi necessário realizar uma segunda marcação com anticorpos secundários fluorescentes (Tabela 2.1):

Protocolo para imunofluorescência indirecta:

1. Recolher as células dos poços de co-cultura e colocar 1×10^5 células para cada marcação a realizar
2. Centrifugar as células durante 7min a 1700rpm
3. Aplicar 100µl de anticorpo – marcado directamente – e ressuspender muito bem a amostra
4. Incubar a 4°C no escuro durante 30min
5. Aplicar 100µl de tampão MACS (0,5%BSA/PBS1x/0,5µM EDTA 0,5µM) para lavar o anticorpo em excesso
6. Centrifugar as células durante 7min a 1700rpm
7. Remover o sobrenadante e repetir o processo de lavagem mais duas vezes com tampão MACS
8. Remover o sobrenadante, juntar 100µl de anticorpo secundário e ressuspender bem a amostra
9. Incubar a 4°C durante 30min no escuro
10. Aplicar 100µl de tampão MACS para lavar o anticorpo em excesso
11. Centrifugar as células durante 7min a 1700rpm
12. Remover o sobrenadante e repetir o processo de lavagem mais duas vezes com tampão MACS
13. Ressuspender as células em 150µl de tampão MACS e passar para tubos de citometria de fluxo

A diluição de trabalho de cada anticorpo foi aferida através do teste de várias diluições. Todos os anticorpos foram testados individualmente para cada tempo experimental (Apêndice IV).

Tabela 2.1. Anticorpos utilizados em citometria de fluxo.

Anticorpo	Concentração	Clone	Isotipo	Células Marcadas	Forma	Anticorpo Secundário
CD4	1/500	CT-4	IgG1	Células CD4 T	FITC	-----
CD4	1/100	CT-4	IgG1	Células CD4 T	Não marcado	Anti-mouse IgG APC
CD8α	1/500	CT-8	IgG1	Células CD8 T	PE	-----
CD3	1/250	CT-3	IgG1	Células CD3 T	PE	-----
Bu1a	1/500	21-1A4	IgG1	Células B jovens e maduras	Biotina	Streptavidina PE
MM	1/100	KUL01	IgG1	Macrofagos/Monócitos	FITC	-----

CAPÍTULO 3 – Resultados:

3. Resultados:

3.1. Organogénese do timo:

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, o desenvolvimento do timo processa-se em duas fases diferentes: numa primeira fase o timo desenvolve-se independentemente de interações entre progenitores hematopoiéticos e as TEC. Numa segunda fase o timo desenvolve-se devido às interações entre as TEC e os progenitores hematopoiéticos que colonizam o timo a partir do dia E6 (Nehls *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 2009).

De forma a compreender melhor o desenvolvimento e formação do timo, foram isolados timos em diferentes dias de desenvolvimento embrionário do embrião da galinha (E6, E8, E10, E12 e E14). Posteriormente foram incluídos em parafina, seccionados, corados com HE e analisados morfológicamente ou por imunohistoquímica.

Em embriões de E6 é possível verificar que o timo tem uma forma alongada e o epitélio tímico é todo homogéneo (Figura 3.1 – A - C). Foi realizada por imunohistoquímica uma marcação com o anticorpo HNK1 que neste estágio de desenvolvimento, identifica as células da crista neural em migração. É possível ver positividade para HNK1 no tubo neural e no nervo vago (Figura 3.1- D e E). A marcação foi negativa para o timo. Este resultado corrobora resultados já obtidos em estudos anteriores que demonstram que células da crista neural só contribuem para a formação da cápsula do timo a partir do dia 6,5 de desenvolvimento (Le Douarin e Jotereau, 1975) (Figura 3.1 – D, F). Por outro lado, já é possível ver algumas células da crista neural, HNK1⁺ na paratiróide (Figura 3.1 -B).

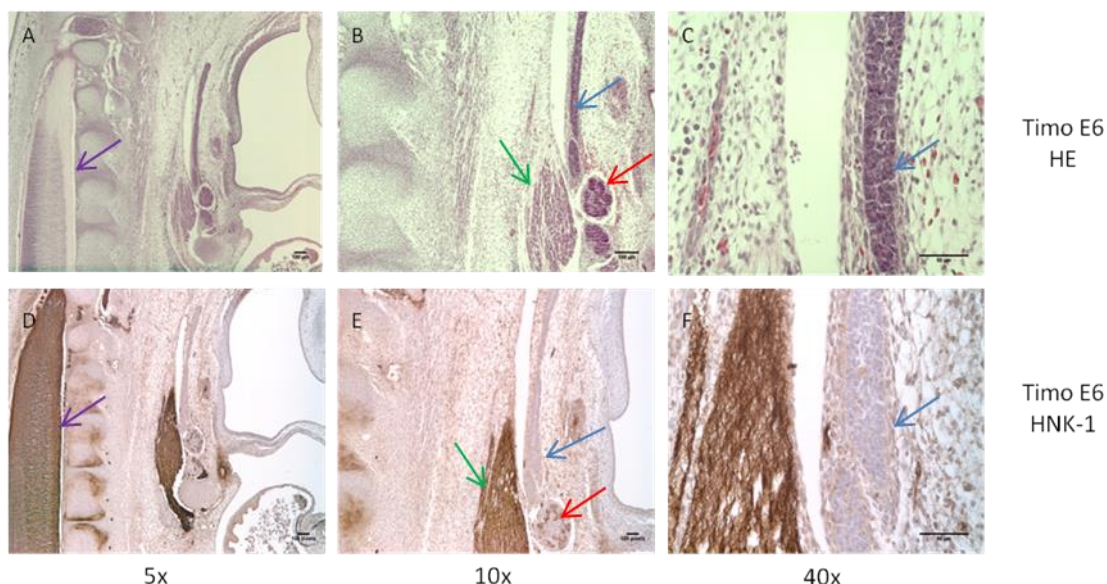


Figura 3.1 – Corte sagital de embriões de galinha com 6 dias de desenvolvimento. A-C – Embriões corados em HE em diferentes ampliações (5x, 10x e 40x da esquerda para a direita). O epitélio tímico é homogéneo não sendo possível distinguir córtex de medula. D – F – Embriões imuno-marcados com HNK1 m diferentes ampliações (5x, 10x e 40x da esquerda para a direita). D – É possível ver a marcação do tubo neural (seta roxa) e do nervo vago (seta verde). E – A paratiróide (seta vermelha) apresenta algumas células da crista neural. F – Ao dia E6 o timo (seta azul) ainda não apresenta células da crista neural. Setas Roxas – Tubo Neural; Setas Verdes – Nervo Vago; Setas Azuis Timo E6; Setas vermelhas paratiróide. Escala fotos A e D =100µm e restantes fotos escala=50 µm.

Embrões com 8 dias de desenvolvimento não apresentam timos com diferenciação entre medula e córtex (Figura 3.2 - A-C).

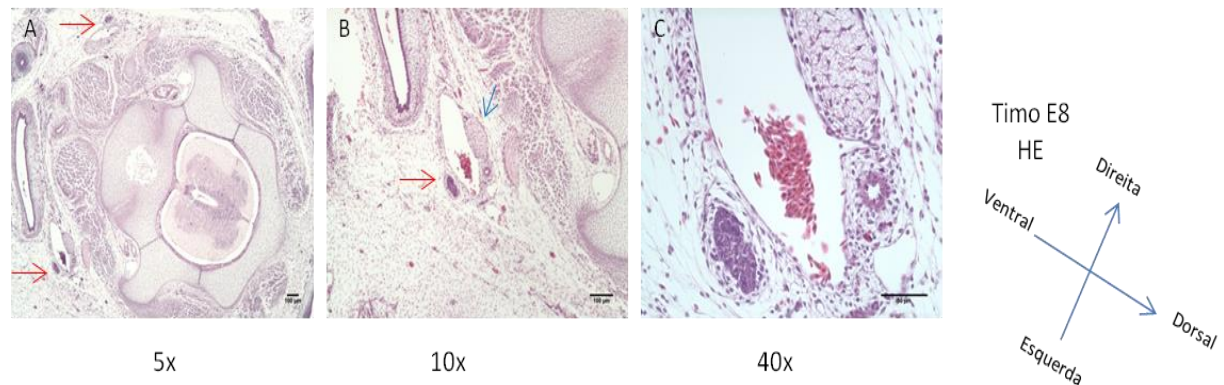


Figura 3.2 – Corte transversal de embrião de galinha com 8 dias de desenvolvimento. A-C – Embrião com 8 dias corados em HE em diferentes ampliações (5x, 10x e 40x da esquerda para a direita). A – Setas a vermelho indicam a localização do timo. B – Seta a vermelho indica a localização do timo e a seta a azul indica a localização do nervo vago. C – É possível constatar que o epitélio tímico é homogêneo não sendo possível distinguir córtex de medula. Escala das fotos A e B=100µm e foto C =50µm.

Nos timos isolados de embriões com 10 dias de desenvolvimento já é possível observar uma diferenciação entre córtex e medula, aparecendo o córtex com maior densidade celular do que a medula (Figura 3.3 – A-C). Ao dia 12 de desenvolvimento embrionário, os timos já possuem a medula e o córtex completamente diferenciados (Figura 3.3 – D – F).

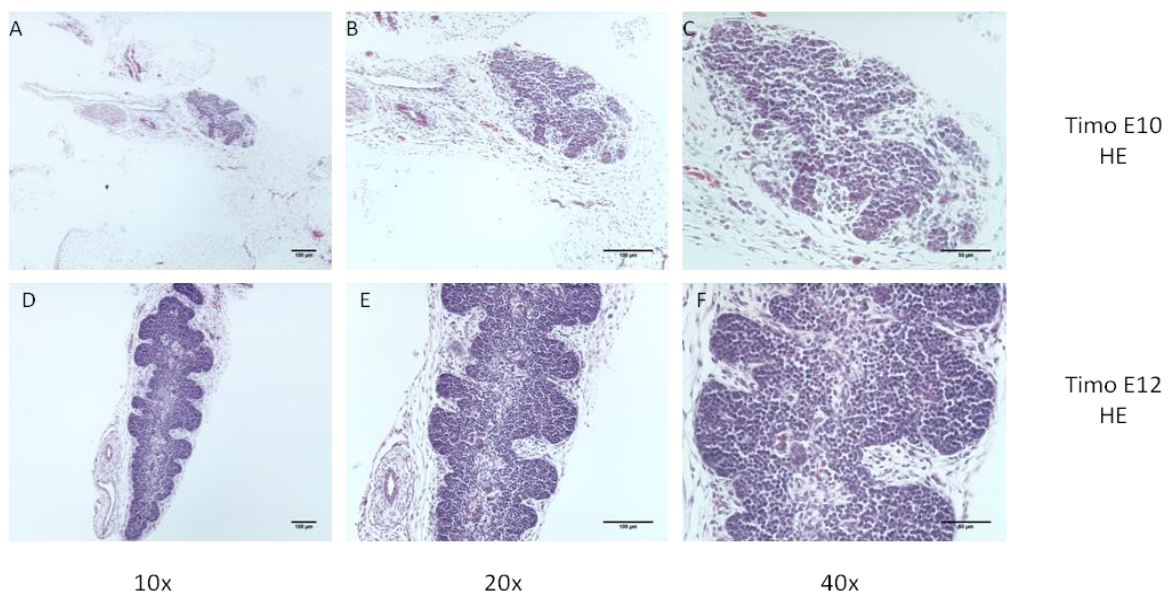


Figura 3.3 – Timos isolados de embriões de galinha com 10 e 12 dias de desenvolvimento. A-C – Corte transversal do timo com 10 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). B e C – É possível constatar que o epitélio tímico é heterogêneo, sendo possível distinguir córtex de medula. É possível ver o início da formação dos diferentes lóbulos do timo. D – F – Timo com 12 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). D a F – É possível verificar que o epitélio tímico é heterogêneo, sendo possível distinguir córtex de medula. Escala das fotos A, B, D, E=100µm e fotos C e F=100µm.

Nos timos E14 acentua-se a distinção entre a região do córtex e medula, continuando a ser o córtex mais denso que a medula (Figura 3.4 – A-C). É possível ver pela primeira vez invaginações da cápsula mesenquimatosa, formando assim vários septos que originam a divisão entre os diferentes lóbulos. É possível identificar na medula estruturas mais eosinófilas de maiores dimensões que correspondem aos corpúsculos de Hassall (Figura 3.4 – D – F).

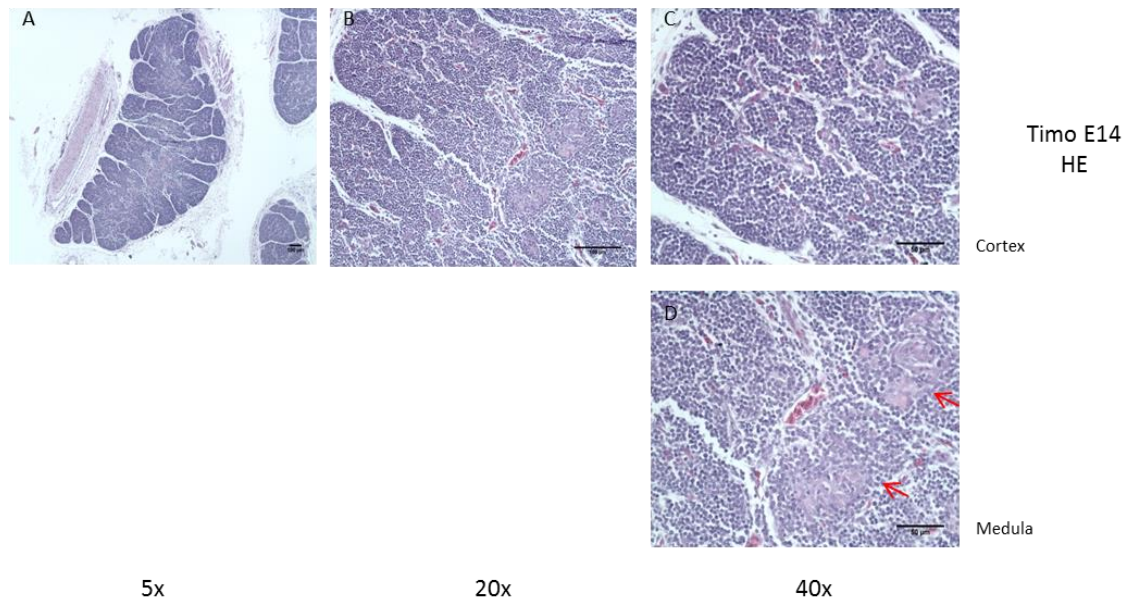


Figura 3.4 – Corte Transversal de timo isolados de embriões de galinha com 14 dias de desenvolvimento.

A-D – Timo com 14 dias corados em HE em diferentes ampliações (5x, 20x e 40x da esquerda para a direita). A – É possível ver os diferentes lóbulos do timo, subdivididos em lóbulos B e C – É possível constatar que o epitélio tímico é heterogéneo, sendo possível distinguir córtex de medula. D – Na medula encontramos corpúsculos de Hassall (setas vermelhas). Escala das fotos A, B =100µm e foto C e D=50µm.

Com estes resultados, podemos concluir que até dia E6 as células da crista não parecem contribuir para a formação do timo. Além disso, verifica-se que o epitélio tímico já está a diferenciar-se em córtex e medula a partir do dia E8, estando totalmente diferenciado ao dia E14. Confirmando, assim, que as interações entre os CPL e as CET são essenciais para a diferenciação do epitélio tímico.

3.2. Organogénese do baço:

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, o desenvolvimento do baço inicia-se as 48h pós-fertilização. O baço é um órgão hematopoiético muito importante, desempenhando um papel importante a linfopoiese B. O baço começa a ser colonizado por CPL a partir do dia E3.5/E6 desenvolvimento (Jaffredo *et al.* 2005).

De forma a compreender melhor o desenvolvimento do baço, foram isolados baços com diferentes dias de desenvolvimento (E6, E8, E10, E12 e E14) e posteriormente foram incluídos em parafina para corte em secções. Os cortes foram posteriormente corados com HE.

Ao dia 6 de desenvolvimento embrionário é possível verificar que o baço ainda não está individualizado e ainda se encontra ligado ao estômago do embrião (Figura 3.5 – A). O epitélio do baço apresenta-se bastante denso e com poucos sinusóides (Figura 3.5 – A - C). Baços E8 já apresentam mais sinusóides e é menos denso, contudo, ainda não é um órgão individualizado (Figura 3.5 – D - F). Estes dados estão de acordo com outros estudos que demonstram que os sinusóides com eritrócitos aparecem ao dia E5 (Fred Davison, 2008).

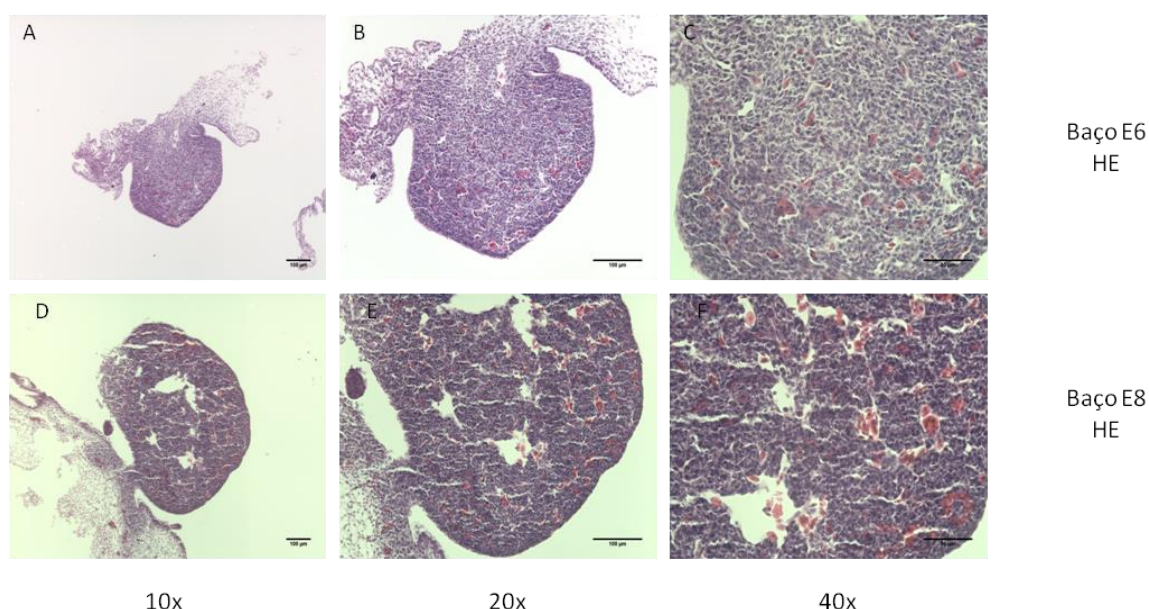


Figura 3.5 – Corte Transversal de baços isolados de embriões de galinha com 6 e 8 dias de desenvolvimento. A-C – Baço com 6 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). A – O baço ainda está individualizado. B e C – É possível constatar que o baço é bastante denso apresentando poucas sinusóides. D – F – Timo com 8 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). D – O baço ainda não está individualizado. E a F – É possível verificar que o baço apresenta-se menos denso e com mais sinusóides com eritrócitos. Escala das fotos A, B, D e E=100µm e fotos C e F=50µm.

O baço com 10 dias de desenvolvimento já se encontra totalmente individualizado, estando apenas conectado pela veia esplénica na face ventral (Figura 3.6 – A). O epitélio do baço apresenta-se com menor densidade celular e com muitos sinusóides (Figura 3.6 – A - C).

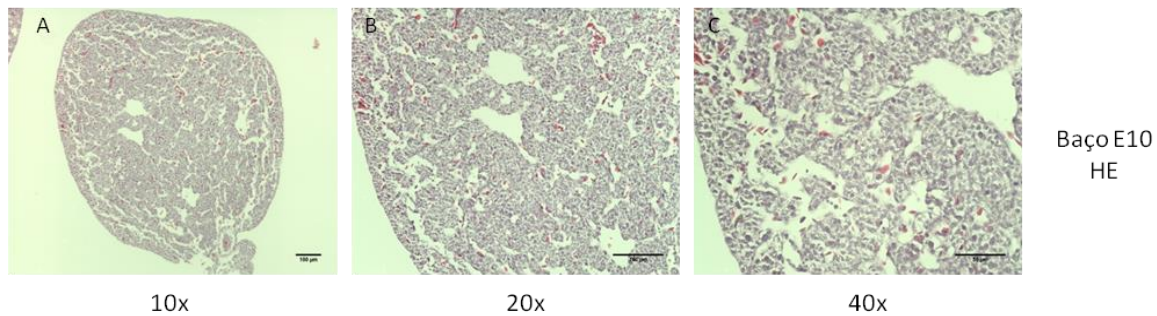


Figura 3.6 – Corte Transversal de baços isolados de embriões de galinha com 10 dias de desenvolvimento. A-C – Baço com 10 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). A – O baço já se encontra totalmente individualizado. B e C – É possível constatar que o baço é menos denso quando comparado com os baços de dia E6 e E8, apresentando mais sinusóide e com um tamanho maior. Escala das fotos A, B=100µm e foto C=50µm.

No que respeita aos baços com 12 e 14 dias de desenvolvimento é possível verificar que o epitélio do baço E12 apresenta-se bastante denso e com sinusóides mais pequenos e com um maior número de eritrócitos que ao dia E10 (Figura 3.7 – A - C). Apresenta células mais basófilas em forma de cordão na periferia do órgão. A cápsula do órgão parece também mais definida e mais espessa a partir do dia 12 de desenvolvimento (Figura 3.7 – C). Este resultado é suportado por estudos anteriores que demonstram que a partir do dia E11 começa a aparecer uma rede de suporte constituída por colagénio tipo I e II (Yassine *et al.*, 1989). Ao dia 14 de desenvolvimento a histologia do baço apresenta-se muito semelhante ao de dia E12, isto é, bastante homogêneo e sem diferenciação em polpa vermelha e branca (Figura 3.7 – D). Estrutura muito compacta e com muitos eritrócitos no seu interior (Figura 3.7 – D - F).

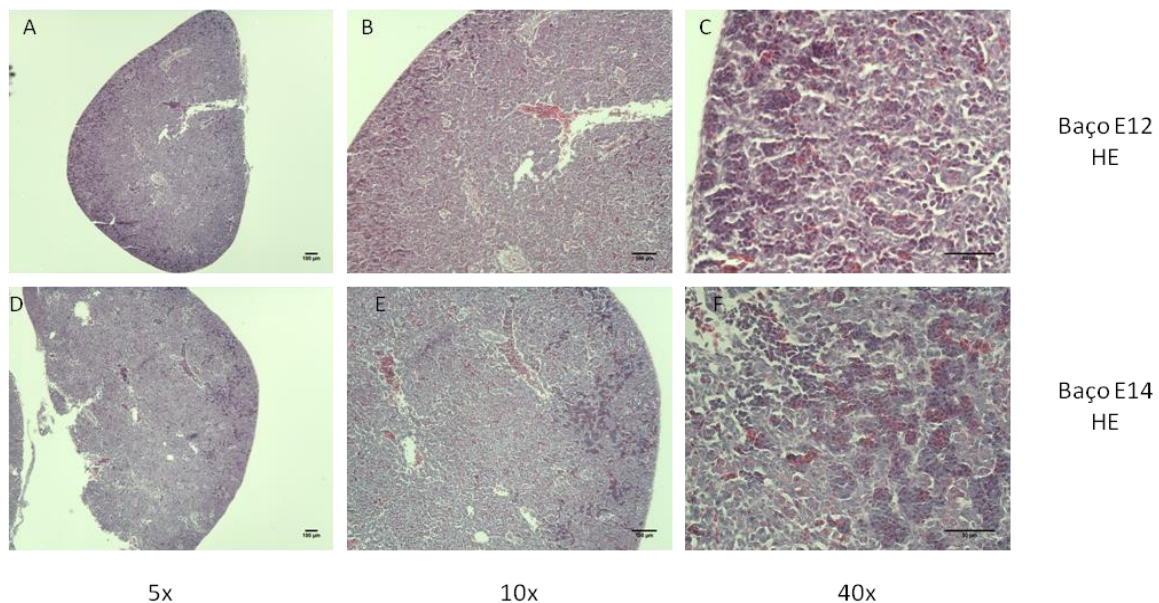


Figura 3.7 – Corte Transversal de baços isolados de embriões de galinha com 12 e 14 dias de desenvolvimento. E12 corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). A – Aspecto geral. B e C – É possível constatar que o baço é bastante denso, apresentando alguns sinusóides e muitos eritrócitos. C – O baço apresenta uma cápsula mais definida e mais espessa. Apresenta também células basófilas em cordão na periferia. D – F – O baço com 14 dias corados em HE em diferentes ampliações (10x, 20x e 40x da esquerda para a direita). D – O baço apresenta um tamanho maior quando comparado com o baço com 12 dias de desenvolvimento. E e F – É possível verificar que o baço é bastante denso, apresentando algumas sinusóides e muitos eritrócitos. F - Apresenta cordões de células basófilas no seu interior. Escala das fotos A, B, D, E=100µm e fotos C e F=50µm.

Com a análise dos cortes histológicos do baço, podemos verificar ao longo do desenvolvimento embrionário, uma alteração substancial da morfologia do órgão. Nomeadamente, apresenta um elevado número de sinusóides, cordões celulares e evidente presença de eritrócitos, indicador de ser um órgão muito irrigado. Isto implica que o baço pode ter uma função essencial na hematopoiese, sugerindo uma semelhança com o fígado fetal dos mamíferos. Verifica-se, também, que por volta do dia E12 o baço apresenta cordões de células basófilas na periferia, sugerindo que a granulopoiese pode ter início por volta do dia E11.

3.3. Análise histológica das células isoladas de timos com E10, E12 e E14:

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, o desenvolvimento do timo processa-se em duas fases diferentes: numa primeira fase o timo desenvolve-se independentemente de interações entre os LPC e as TEC. O timo começa a ser colonizado por progenitores hematopoéticos pelo dia 6 de desenvolvimento. Para o estudo da dinâmica da diferenciação T dos progenitores hematopoieticos, analisámos histologicamente (coloração por HE) os progenitores isolados de timos com diferentes dias de desenvolvimento (E10, E12 e E14). As células foram analisadas e agrupadas segundo 5 categorias morfológicas diferentes: 1 – Células com uma morfologia de difícil categorização; 2 – Células de pequenas dimensões elevado ratio núcleo/citoplasma; 3 – Células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma; 4 – Células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos; 5 – Células de grandes dimensões com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos (Figura 3.8).

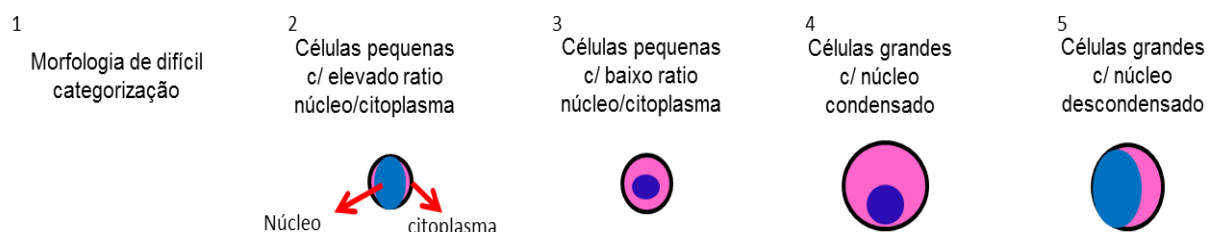


Figura 3.8. Categorias morfológicas utilizadas na análise de células isoladas de timos e baços. 1- Células com uma morfologia de difícil categorização; 2 – Células de pequenas dimensões com elevado ratio núcleo/citoplasma; 3 – Células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma; 4 – Células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos; 5 - Células de grandes dimensões com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos.

A análise morfológica de progenitores isolados de timos com 10 dias de desenvolvimento revelou que 47% das células isoladas apresentavam um fenótipo bastante heterogéneo (Figura 3.8 – 1), 32% eram células semelhantes a linfócitos com núcleos condensados e elevado ratio núcleo/citoplasma (Figura 3.8 – 2), 10% eram semelhantes a linfócitos com núcleos muito condensados e baixo ratio núcleo/citoplasma (Figura 3.8 – 3), 6,5% eram células de grandes dimensões e com núcleo condensado e com grânulos citoplasmáticos e 4% eram células de grandes dimensões, com núcleo descondensado e com grânulos no citoplasma (Figura 3.8 – 4 e 5 respectivamente). Ao dia E10 os eritrócitos não predominam na amostra (dados não mostrados).

Das células isoladas a partir de timos com 12 dias de desenvolvimento 16,85% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável, cerca de 3 vezes menos células que as isoladas ao dia E10 (Figura 3.9), 43% eram células semelhantes a linfócitos com núcleos condensados e elevado ratio núcleo/citoplasma, valor 10% superior ao encontrado no timos E10 (Figura 3.9), apenas 5% eram linfócitos com núcleos muito condensados e com baixo ratio núcleo/citoplasma, metade das encontras em E10 (Figura 3.9), 10,82% eram células grande com núcleo condensado e com grânulos, cerca de 5% mais células que em E10 e 23,62% eram células grandes com núcleo descondensado e com grânulos, um número 5,5 vezes maior que o número isolado em E10 (Figura 3.9). Ao dia E12 os eritrócitos não predominam na amostra (dados não mostrados).

Das células isoladas a partir de timos com 14 dias de desenvolvimento 21% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável, um aumento de 6% em relação ao dia 12 (Figura 3.9). Das restantes, 30% eram células semelhantes a linfócitos com núcleos condensados e elevado ratio núcleo/citoplasma, menos 10% no dia E12 (Figura 3.9), 25% eram linfócitos com núcleos muito condensados e com baixo ratio núcleo/citoplasma, um aumento de 20 % quando comparado com E12 (Figura 3.9), 15% eram células de grandes dimensões com núcleo condensado e com grânulos citoplasmáticos, cerca de 5% mais células que em E12 e 9% eram células grandes com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos, menos de metade das células isoladas em E10 (Figura 3.9). Ao dia E14 não foi possível identificar os eritrócitos porque durante a optimização de protocolo, a colocação da amostra em álcool 50% provocou a lise de eritrócitos. Podemos concluir que ao longo dos dias de desenvolvimento embrionário estudados, as células mais indiferenciadas (categoria 1) vão diminuindo e adquirindo morfologia de células mais diferenciadas, especifica de células hematopoiéticas que predominam no neste órgão. (Figura 3.9).

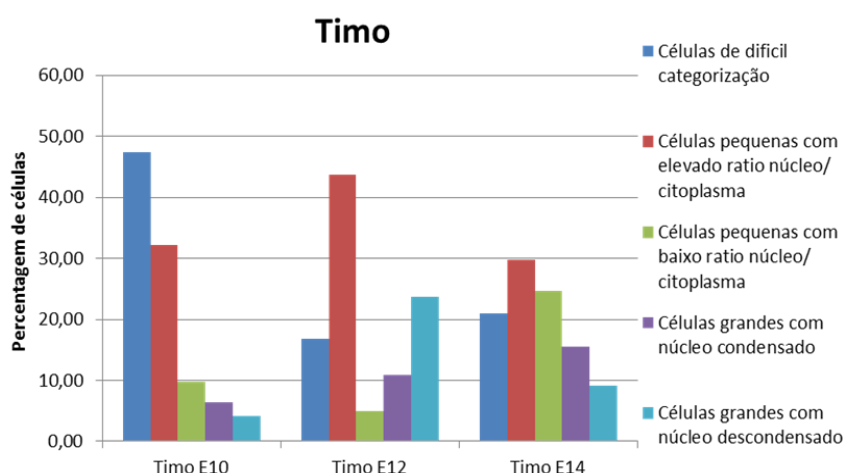


Figura 3.9 – Distribuição dos vários tipos celulares presentes em timos com 10, 12 e 14 dias de desenvolvimento. Azul-escuro – Células com uma morfologia de difícil categorização; Vermelho – Células de pequenas dimensões elevado ratio núcleo/citoplasma; Verde – Células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma; Roxo – Células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos; Azul-claro – Células de grandes dimensões com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos.

Estes dados confirmam que o timo é colonizado ao dia E12 devido ao aumento de células de pequenas dimensões elevado ratio núcleo/citoplasma, característica comum de timócitos. E que, ao dia E14 parecem diferenciar-se em células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma e núcleo condensado.

3.4. Análise fenotípica das células isoladas de baço com E8, E10, E12 e E14:

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, o desenvolvimento do baço inicia-se às 48 pós-fertilização. O baço começa a ser colonizado por progenitores hematopoéticos a partir do dia 3,5 de desenvolvimento. Para o estudo da dinâmica da diferenciação dos progenitores hematopoieticos, analisámos fenotipicamente (coloração por HE) os progenitores isolados de baço com diferentes dias de desenvolvimento (E8, E10, E12 e E14). As células foram analisadas e agrupadas segundo 5 categorias morfológicas diferentes: 1 – Células com uma morfologia de difícil categorização; 2 – Células de pequenas dimensões elevado ratio núcleo/citoplasma; 3 – Células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma; 4 – Células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos; 5 – Células de grandes dimensões com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos (Figura 3.8).

A análise fenotípica dos progenitores isolados de baços com 8 dias de desenvolvimento revelou 58,33% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável (Figura 3.10), 8% era de pequenas dimensões com elevado ratio núcleo/citoplasma (Figura 3.10), 12,5% eram células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma (Figura 3.10), 12,9% eram células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos (Figura 3.10). Ao dia E8 os eritrócitos são predominantes na amostra (dados não mostrados).

Das células isoladas a partir de baços com 10 dias de desenvolvimento 54,8% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável, a mesma percentagem de células que as isoladas ao dia E8 (Figura 3.10), 11% eram células de pequenas dimensões com elevado ratio núcleo/citoplasma, número 3% superior ao encontrado nos baços E8 (Figura 3.10), apenas 12,6% eram células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma, o mesmo número encontrado em E8 (Figura 3.10), 14,4% eram células grande com núcleo condensado e com grânulos citoplasmáticos, cerca de 5% mais células que em E8 e 7,5% eram células grandes com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos, menos 1% quando comprado E8 (Figura 3.10). Ao dia E10 os eritrócitos continuam a ser predominantes na amostra (dados não mostrados).

Das células isoladas a partir de baços com 12 dias de desenvolvimento 31% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável, menos 23% menos células em relação ao dia 10 (Figura 3.10), 32% eram células de pequenas dimensões com elevado ratio núcleo/citoplasma, mais 20% quando comparado no dia E10 (Figura 4.24), 13,5% eram células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma, um número ligeiramente maior que em E10 (Figura 3.10), 15% eram células grande com núcleo condensado e com grânulos citoplasmáticos, cerca de 1% mais células que em E10 e 8% eram células grandes com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos,

cerca de 1% mais células que em E10 (Figura 3.10). Ao dia E12 os eritrócitos não são predominantes na amostra.

Das células isoladas a partir de baços com 14 dias de desenvolvimento 17% das células isoladas apresentavam uma morfologia muito variável, menos de metade das células quando comparado com dia 12 (Figura 3.10), 34% eram de pequenas dimensões com elevado ratio núcleo/citoplasma, mais 2% quando comparado no dia E12 (Figura 3.10), 11% eram células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma, um número ligeiramente inferior que em E12 (Figura 3.10), 30% eram células grande com núcleo condensado e com grânulos citoplasmáticos, o dobro das células encontradas ao dia 12 de desenvolvimento e 6,8% eram células grandes com núcleo descondensado e com grânulos, cerca de 1% menos células que em E12 (Figura 3.10). Ao dia E14 os não são identificados devido a uma limitação técnica. Durante a optimização de protocolo as células foram colocadas em álcool 50% e este processo lisou os eritrócitos.

As células com fenótipo variável tem tendência a diminuir ao longo do tempo, isto parece sugerir que estas células se estarão a diferenciar nos outros tipos de células (Figura 3.10).

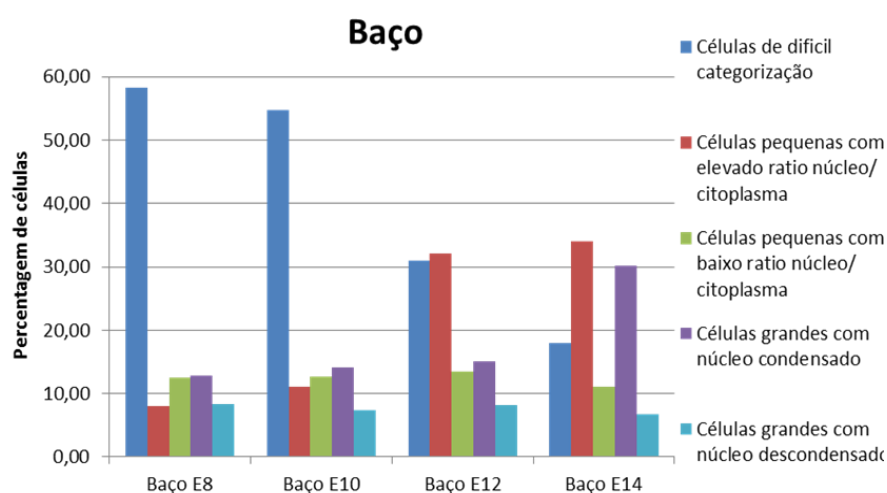


Figura 3.10. Percentagem de células isoladas de baços com 10, 12 e 14 dias de desenvolvimento. **Azul-escuro** – Células com uma morfologia de difícil categorização; **Vermelho** – Células de pequenas dimensões elevado ratio núcleo/citoplasma; **Verde** – Células de pequenas dimensões com baixo ratio núcleo/citoplasma; **Roxo** – Células de grandes dimensões com núcleo muito condensado e com grânulos citoplasmáticos; **Azul-claro** – Células de grandes dimensões com núcleo descondensado e com grânulos citoplasmáticos.

Em conclusão, a partir do dia E10 o número de células com fenótipo variável diminuiu e o número de células de pequenas dimensões sem citoplasma visível aumenta. Este aumento pode sugerir que o baço está a ser colonizado por CPL provenientes dos focos para-aórticos. De acordo com Jaffredo *et al* (2005), ao dia E9 tem início a segunda onda de colonização do órgão, vindos da região da aorta.

3.5. Co-cultura de progenitores hematopoiéticos isolados de timos E13 e E15 com a linha estromal OP9 parental ou transduzida:

Durante o desenvolvimento embrionário das aves, a colonização do timo por progenitores hematopoiéticos ocorre em 3 ondas consecutivas: a primeira acontece ao dia E6.5, seguida por outra ao dia E12 e por fim a terceira ao dia E18. (Jotereau e Le Douarin, 1982; Coltey *et al.*, 1989). Uma vez no timo, a especificação e diferenciação dos progenitores hematopoiéticos em linfócitos T é mediada por várias vias de sinalização entre as quais a via de sinalização Notch.

De forma a compreender como os diferentes ligandos de Notch afectam a especificação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos provenientes de timos de embriões de galinha em diferentes estádios de desenvolvimento, utilizámos um sistema de co-cultura e analisámos fenotipicamente as populações emergentes ao longo do tempo. Estudos anteriores mostraram que este sistema de co-cultura promove a diferenciação dos progenitores hematopoiéticos em células B (Rawlings *et al.* 1995). Porém a sobre-expressão específica de ligandos de *Notch* da família Delta (especificamente DI1 e DI4) promove a diferenciação de progenitores em células T (Jaleco *et al.*, 2001). Para o estudo da dinâmica da diferenciação T dos progenitores hematopoiéticos, analisámos por citometria de fluxo a expressão do co-receptor CD3 e das moléculas acessórias CD4 e CD8. Começámos por caracterizar fenotipicamente os progenitores hematopoiéticos isolados a partir do rudimento tímico de embriões de galinha com 13 (E13) e 15 (E15) dias de desenvolvimento, dado que o isolamento de um número de progenitores suficientes para realizar estes ensaios revelou-se impossível em rudimentos tímicos com menos dias de desenvolvimento. Verificámos que o padrão de distribuição das células isoladas dos timos pelos parâmetros tamanho celular (*Foward Scatter* - FSC) e complexidade citoplasmática (*Side Scatter* - SSC -) é idêntico nos diferentes tempos de desenvolvimento embrionário estudados, E13 e E15 (Figura 3.11 – A1, A5). A análise fenotípica revelou que a maioria das células isoladas de timos E13 cerca de 70% não co-expressam CD4 e CD8 (CD4⁻/CD8⁻) versus 9% que são duplos positivos (DP) para CD4 e CD8 (CD4⁺/CD8⁺), 14,8% expressam apenas CD8 (CD8SP) e 6,5% apenas CD4 (CD4SP) (Figura 3.11 – A e B). Menos 1% das células isoladas co-expressam CD3 e CD4 (CD3⁺/CD4⁺ - 0,334%) ou CD3 e CD8 (CD3⁺/CD8⁺ - 0,0,92%). Apenas cerca de 2,21% das células isoladas expressam CD3 (CD3SP) (Figura 3.11 – A e B). A análise revelou que a maioria das células isoladas de timos E15, 41% são CD4⁺/CD8⁺ versus 38% que são CD4⁻/CD8⁻, 13,8% CD8⁺ e 7% são CD4⁺ (Figura 3.11 – A2, A6 e B1). Cerca 1% das células co-expressam CD3 e CD4 (1.1%) e menos de 1% das células co-expressam CD3 e CD8 (0,54%). Cerca de 2,5% das células isoladas são SP para CD3 (Figura 3.11 – B2 e B3).

Estes dados revelam que as células isoladas a partir de timos E13 apresentam um fenótipo mais imaturo que as isoladas de timos E15.

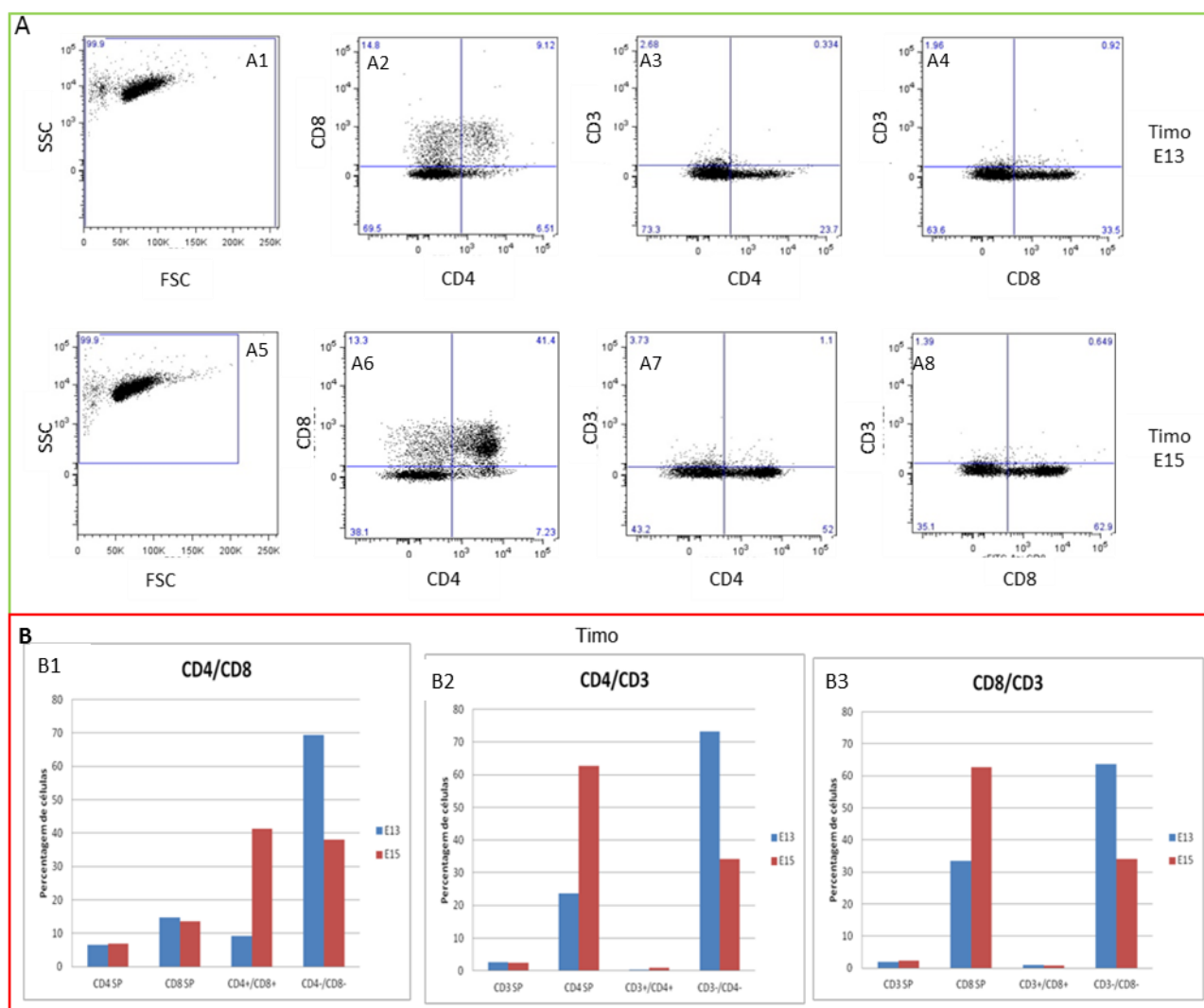


Figura 3.11. Análise fenotípica de populações de células hematopoéticas presentes no timo com 13 (n=1) e 15 (n=2) dias de desenvolvimento. A1 e A5 – Dot plots representativos da análise por citometria de fluxo dos parâmetros tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC). A2 – Análise da expressão dos marcadores CD4 e CD8 em células isoladas de timos E13; A3 - Análise da expressão dos marcadores CD4 e CD3 em células isoladas de timos E13; A4 - Análise da expressão dos marcadores CD8 e CD3 em células isoladas de timos E13; A6 – Análise da expressão de marcadores CD4 e CD8 em células isoladas de timos E15; A7 – Análise da expressão de marcadores CD4 e CD3 em células isoladas de timos E15; A8 – Análise da expressão de marcadores CD8 e CD3 em células isoladas timos E15; B – Percentagem de células que expressam diferentes marcadores de linhagem T quando imuno-marcadas com diferentes combinações de anticorpos: anti-CD4 e anti-CD8 (B1), anti-CD3 e anti-CD4 (B2) ou anti-CD3 e anti-CD8 (B3).

Posteriormente as células isoladas de timos E13 ou E15 foram co-cultivadas, durante 10 dias, sobre uma linha celular estromal OP9 parental (OP9-WT) ou transduzida com os ligandos *Notch*, Delta 1 ou Delta 4 (OP9-DI1 e OP9-DI4 respectivamente). Como controlo foram utilizadas células estromais OP9-WT ou células OP9 transduzidas apenas com o vector retroviral (OP9-Ø).

Aos dias 3, 7 e 10 de co-cultura recolhemos as células hematopoiéticas E13 em suspensão e procedemos à sua caracterização fenotípica por citometria de fluxo. Observámos que ao longo do período de co-cultura existe uma diminuição do número de células de 5×10^5 para 1×10^4 nas condições OP9-Ø, OP9-DI1, OP9-DI4 e de 5×10^5 para $7,5 \times 10^3$ na co-cultura OP9-WT. No entanto ao

dia 3 de co-cultura, a condição OP9 a sobre-expressar DI1 apresenta 3 vezes mais células do que as condições Ø e DI4 e 2 vezes mais células que a condição WT. Verificamos que ao dia 7, a co-cultura OP9-DI1 continua a apresentar maior densidade celular ($5,38 \times 10^4$) que as outras condições (WT – $3,38 \times 10^4$, Ø - 1×10^4 e DI4 - $1,88 \times 10^4$) (Figura 3.12). Ao longo das co-culturas observamos que os progenitores hematopoiéticos E13 co-cultivados em OP9-WT e OP9-Ø apresentavam percentagens idênticas de células positivas para CD4 e CD8 (Apêndice I).

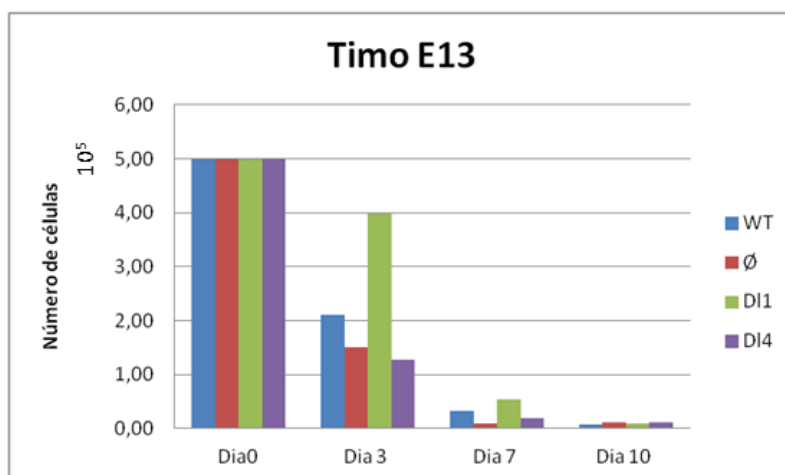


Figura 3.12. Análise da densidade celular obtida nas várias condições de co-cultura. O número de células diminui rapidamente ao longo tempo pelas diversas condições (OP9-WT, OP9-Ø, OP9-DI1, OP9-DI4). Ao dia 3 e 7, a condição OP9-DI1 mantém um número superior de células quando comparado com as outras condições. Ao dia 10 o número de células é residual em todas as condições.

Estes resultados sugerem que a co-cultura em estroma que sobre expressa DI1 favorece a proliferação e/ou viabilidade de progenitores hematopoiéticos isolados de timos com 13 desenvolvimento embrionário.

As células co-cultivadas com os diferentes estromas apresentam uma enorme heterogeneidade celular. É possível identificar 3 subpopulações distintas relativamente ao tamanho e complexidade celular, isto é FSC versus SSC. A subpopulação 1 (G1) é formada por células pequenas com reduzida granularidade citoplasmática, a subpopulação 2 (G2) possui células de tamanho um pouco maior que a subpopulação 1 mas de idêntica complexidade celular. A subpopulação 3 (G3) é constituída por células com tamanho e complexidade celular maiores que todas as outras (G1 e G2). Verificamos ainda que este padrão de distribuição celular sofre alteração durante o período de co-cultura (Figura 3.13). Ao longo do tempo de co-cultura, G1 aumenta em tamanho em todas as condições (na condição OP9-DI1, G1 aumenta de 40% para 81% e nas restantes condições aumenta de 40% para 60%). Ao dia 3 de co-cultura, G2 é semelhante nas condições OP9-WT, OP9-Ø e OP9-DI4, mas apresenta-se maior na condição OP9-DI1 (Figura 3.13). Ao dia 7 de co-cultura, G2 desapareceu em todas as condições com exceção da condição OP9-DI1 (Figura 3.13 e apêndice II). Ao dia 10, a subpopulação desapareceu completamente em todas as condições (Apêndice II).

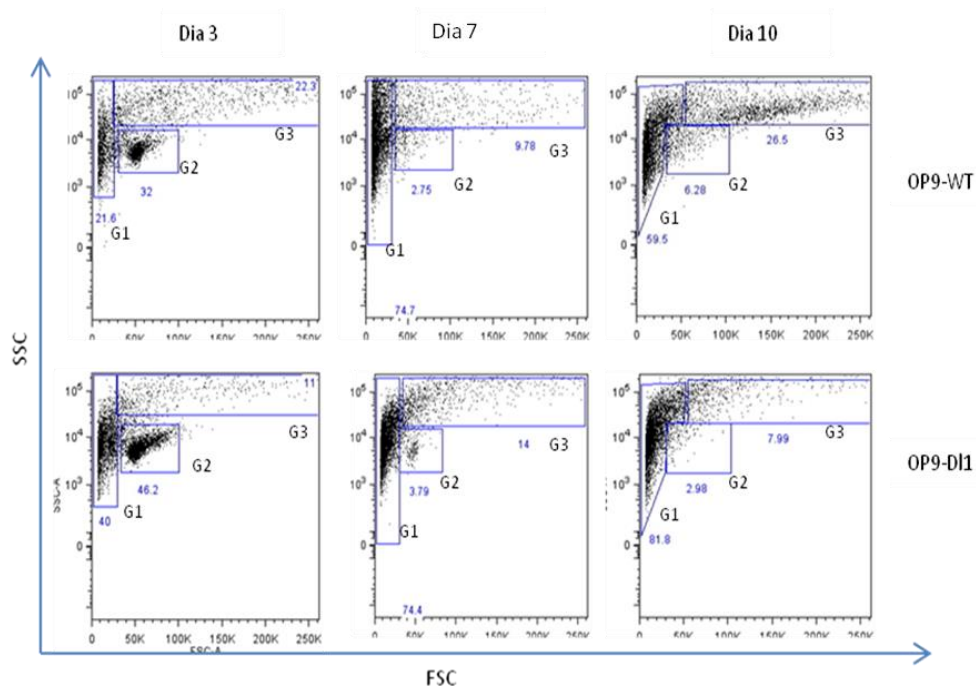


Figura 3.13. Tamanho e complexidade citoplasmática de células hematopoéticas isoladas de timos com 13 dias de desenvolvimento. Tamanho e complexidade citoplasmática (parâmetros FSC e SSC) de células hematopoéticas co-cultivadas com células OP9-WT (painel superior) ou transduzidas com DI1 (OP9-DI1) ao longo do período de co-cultura. G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2; G3 – Subpopulação 3;

A caracterização fenotípica feita por citometria de fluxo baseou-se na expressão de um painel de marcadores membranares (CD3, CD4 e CD8) adquiridos ao longo do tempo de co-cultura. Os resultados obtidos ao dia 3 de co-cultura mostram que G1 representa 16,1% da população celular total e o número de células que co-expressa $CD4^+/CD8^+$ ($2,63 \times 10^4$) é superior na condição que sobre-expressa DI1 quando comparado com as restantes condições (Figura 3.14 - A). G2 apesar de apresentar a mesma percentagem de células $CD4^+/CD8^+$ em todas as condições (cerca de 72%), o número absoluto de células $CD4^+/CD8^+$ presentes na condição DI1 ($1,31 \times 10^5$) é aproximadamente o triplo dos valores observados nas condições WT e \emptyset ($4,8 \times 10^4$ e $4,0 \times 10^4$, respectivamente) e 3,5 vezes superior à quantidade de células presentes na condição DI4 ($2,5 \times 10^4$) (Figura 3.14 - B). Ao dia 7 de co-cultura, as células da subpopulação 1 não expressam CD4, CD8 ou CD3 nas condições OP9-WT e OP9- \emptyset , e apresenta um número reduzido de células $CD4^+/CD8^+$ nas co-culturas com OP9-DI1 e OP9-DI4 ($6,4 \times 10^2$ e $5,5 \times 10^2$, respectivamente). Em relação à subpopulação 2, o número de células que co-expressam simultaneamente CD4 e CD8 diminuiu, sendo a condição DI1 aquela que apresenta um maior número de células positivas para estes marcadores ($6,6 \times 10^2$) versus OP9-WT, OP9- \emptyset e OP9-DI4 – 4×10^2) (Figura 4.5- B). Ao dia 10 de co-cultura, apenas a condição OP9-DI1 apresenta um número residual de células $CD4^+/CD8^+$. (Apêndice 1)

A análise fenotípica de G3 revelou não existir expressão para os marcadores estudados, sugerindo com base no tamanho complexidade que estas células poderão ser eritrócitos, macrófagos e megacariócitos.

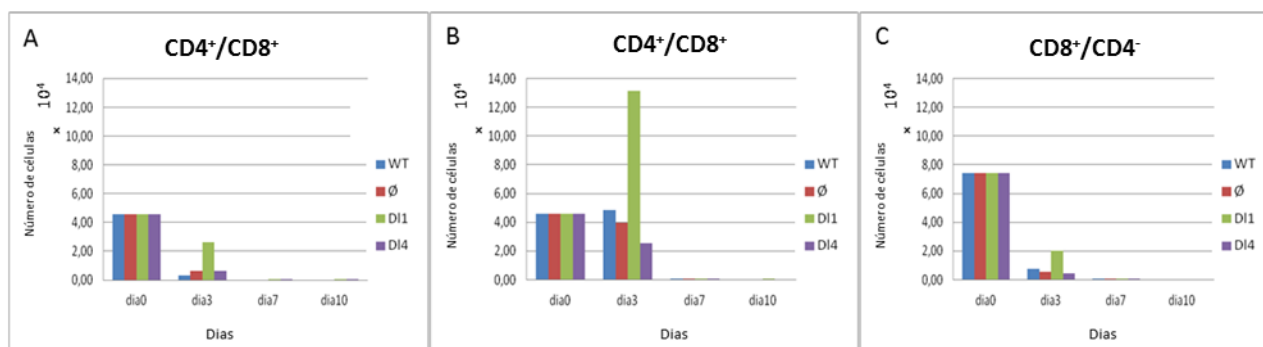


Figura 3.14. Número de células hematopoéticas E13 que expressam CD4 e CD8 durante a co-cultura.

Análise por citometria de fluxo da expressão de CD4 e CD8 na subpopulação G1 (A) e G2 (B) (células co-cultivadas em OP-9 WT, Ø, DI1 e DI4 durante 10 dias). C – Número de células da subpopulação 2 a expressar apenas CD8.

Os células progenitoras isoladas a partir do rudimento tímico E15 foram co-cultivadas nas mesma condições que as células isoladas do rudimento tímico E13 descritas anteriormente. As células presentes no sobrenadante foram recolhidas nos dias 3, 5, 7, 10 e 14 de co-cultura, posteriormente contabilizadas e analisada a expressão de alguns antígenos por citometria de fluxo (CD4, CD8 e CD3). Observámos que a densidade celular diminui ao longo do período de co-cultura para as diferentes condições estudadas (de 5×10^5 para $1,5 \times 10^4$ nas co-culturas OP9-WT e OP9-Ø, de 5×10^5 para 8×10^4 na condição OP9-DI1 e de 2×10^5 para $1,88 \times 10^4$ na condição OP9-DI4). Verificámos que até ao dia 7 de co-cultura, a condição OP9-DI1 apresenta um maior número de células quando comparada com as restantes condições (Figura 3.15).

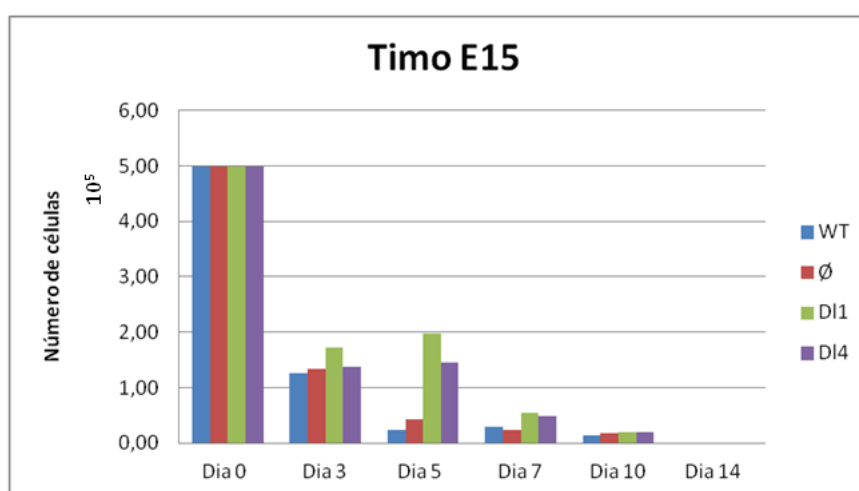


Figura 3.15. Densidade celular de progenitores hematopoiéticos nas várias condições de co-cultura (OP9-WT, OP9-Ø, OP9-DI1, OP9-DI4). O número de células diminui ao longo do tempo de co-cultura. Ao dia 3, 5 e 7 a condição OP9-DI1 apresenta o maior número de células. A partir do dia 10, o número de células presente em todas as condições é residual. Ao dia 14 não foi possível recolher células suficientes para análise por citometria de fluxo.

Estes resultados parecem sugerir que a co-cultura em estroma que sobre expressa DI1 favorece a proliferação/viabilidade das células isoladas de timos com 15 dias de desenvolvimento. Tal como observado anteriormente, as células presentes no sobrenadante das co-culturas apresentam uma grande heterogeneidade celular, distribuindo-se por 3 subpopulações com tamanhos e complexidade citoplasmática diferentes. Também estas subpopulações apresentam alterações de morfologia que variam ao longo do período de co-cultura (Figura 3.16).

Durante a experiência de co-cultura, G1 aumenta em tamanho de 40% para 60% na condição WT, de 57% para 69% na condição Ø, de 52% para 80% na condição DI1 e de 57% para 76% na condição DI4 (Figura. 3.16). Ao dia 3 de co-cultura, o tamanho de G2 é maior na condição WT (30%) em relação às restantes condições (20%) (Figura. 3.16). Em contraste com o que acontece ao terceiro dia da experiência de co-cultura E13, no terceiro dia da co-cultura de E15 G2 apresenta um fenótipo celular diferente, sendo composta por 2 tipos celulares distintos (Figura 3.16). A partir do dia 5 de co-cultura G2 é apenas constituída por uma população com um tamanho celular inferior. Ao dia 7 de co-cultura apenas a condição DI1 apresenta células em G2 (Figura 3.16). A partir de dia 10, G2 não é visível em nenhuma das condições experimentais (Figura 3.16).

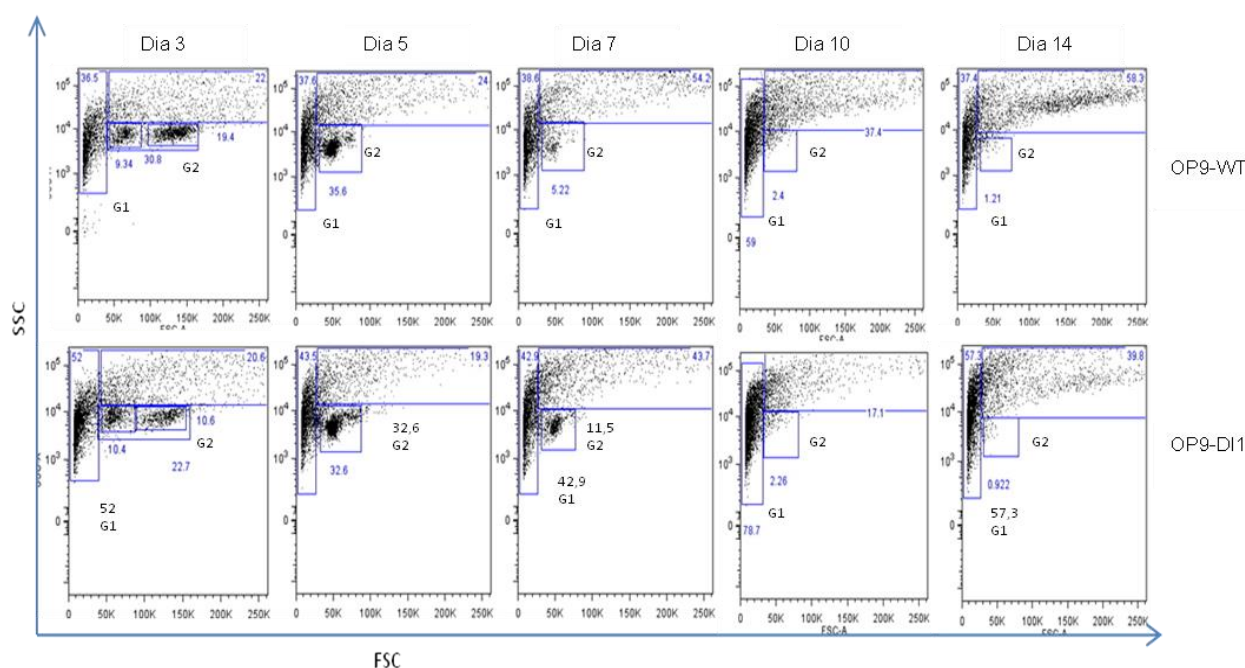


Figura 3.16. Tamanho e complexidade citoplasmática de células co-cultivadas hematopoéticas isoladas de timos com 15 dias de desenvolvimento. Tamanho e complexidade citoplasmática (parâmetros FSC e SSC) de células co-cultivadas OP-9 WT (painel superior) e OP9 – DI1 (transduzida para sobre-expressar DI1 painel inferior) ao longo do período de co-cultura. G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2;

Os resultados obtidos ao dia 3 de co-cultura demonstram que G1 apresenta um maior número de células $CD4^+/CD8^+$ nas condições que expressam DI1 e DI4 ($3,68 \times 10^3$ e $3,5 \times 10^3$ respectivamente) quando comparado com as condições OP9-WT e OP-9Ø ($1,1 \times 10^3$ e $1,9 \times 10^3$ respectivamente). A condição que sobre expressa DI1 apresenta uma subpopulação 2 com duas vezes mais células $CD4^+/CD8^+$ ($1,8 \times 10^4$) do que o valor observado nas outras condições (OP9-WT – $7,3 \times 10^3$, OP9-Ø – $9,5 \times 10^3$ e OP9-DI4 – $9,1 \times 10^3$). Ao dia 3, o número de células $CD4^+/CD3^+$ aumenta em todas as condições (de 5×10^3 células no dia 0 para 1×10^4 na condição OP9-WT, de $1,45 \times 10^4$ na condição OP9-Ø e OP9-DI4 e $1,84 \times 10^4$ na condição OP9-DI1) (Figura 3.17 - D). O mesmo se verifica para a população de células que expressam $CD8^+/CD3^+$ (aumenta de $4,25 \times 10^3$ células no dia 0 para $1,2 \times 10^4$ na condição OP9-WT, para $1,5 \times 10^4$ na condição OP9-Ø e OP9-DI4 e $1,92 \times 10^4$ na condição OP9-DI1) (Figura 3.17 - C). Ao dia 7 de co-cultura, a subpopulação 1 das condições OP9-WT e OP9-Ø só apresenta células $CD4^+/CD8^+$ ($5,3 \times 10$ e $2,74 \times 10$ respectivamente). Em contraste, as condições que sobre-expressam DI1 e DI4 apresentam um pequeno número de células $CD4^+/CD8^+$ ($7,8 \times 10$ e $1,9 \times 10$). As condições OP9-DI1 e OP9-DI4 apresentam também algumas células $CD4^+/CD8^+$ ($2,48 \times 10^2$ e $9,5 \times 10$ respectivamente). O número de células a expressar $CD8^+/CD4^+$ na subpopulação 2 diminui, sendo superior na condição a sobre-expressar DI1 ($6,4 \times 10^2$) e DI4 ($1,7 \times 10^2$) quando comparada com as restantes condições (OP9-WT – 4×10 e OP9-Ø – 3×10) (Figura 3.17 - B). A partir de dia 10, não há células positivas para os marcadores estudados em qualquer condição. A análise fenotípica da subpopulação 3 não apresentou células positivas para os marcadores estudados.

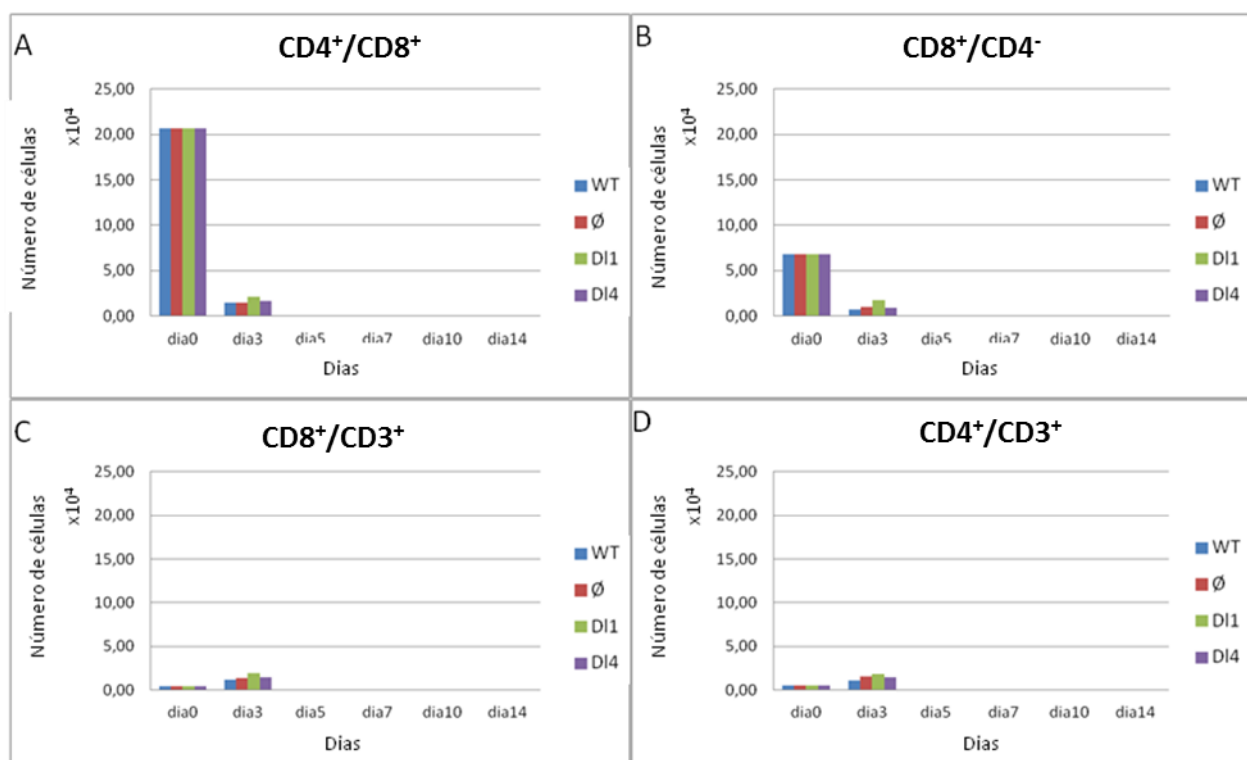


Figura 3.17. Número de células hematopoéticas de G2 que expressam CD3, CD4 e CD8 durante a experiência de co-cultura. A e B – Análise por citometria da expressão de CD4 e CD8 na subpopulação 2 (células co-cultivadas em OP9-WT, OP9- Ø, OP9-DI1 e OP-9DI4 durante 14 dias); C e D – Análise por citometria da expressão de CD3, CD4 e CD8 na subpopulação 2 (células co-cultivadas em OP9-WT, OP9-Ø, OP9-DI1 e OP9-DI4 durante 10 dias);

Como observado anteriormente, em ambas as experiências de co-cultura com progenitores hematopoiéticos isolados de E13 e E15, a sobre-expressão de DI1 aumenta a sobrevivência/proliferação celular e promove a diferenciação de células CD4⁺/CD8⁺. Na experiência de co-cultura E13, o valor da intensidade média de fluorescência ao dia 3 de co-cultura para o marcador CD8 é superior na condição DI1 (MFI= 522) quando comparado com as outras condições (MFI=448 na condição OP9-WT, MFI=451 na condição OP9-Ø e MFI=462 na condição a sobre-expressar DI4). Na experiência de co-cultura E15, a intensidade média de fluorescência do marcador CD8 ao dia 3 de co-cultura é superior na condição OP9-DI1 (MFI= 58921) relativamente às outras condições (MFI=48395 na condição OP9-WT, MFI=58280 na condição OP9-Ø e MFI=53384 na condição OP9-DI4). A diferença entre as intensidades médias de fluorescência das duas experiências sugere, que as células recolhidas na co-cultura E15 são mais diferenciadas que as células recolhidas na co-cultura E13 pois apresentam níveis de fluorescências mais altas (apresentam um maior número de receptores na superfície da célula).

Podemos concluir que, a maioria das células isoladas de timos com 13 dias de desenvolvimento são menos diferenciadas (CD4⁻/CD8⁻) em comparação com as células isoladas de timos com 15 dias de desenvolvimento (CD4⁺/CD8⁺). Não só pela presença de co-expressão dos dois marcadores mas também pela diferença entre as intensidades médias de fluorescência das duas experiências, sugerindo que as células recolhidas na co-cultura E15 são mais maduras que as células recolhidas na co-cultura E13. Os resultados mostram adicionalmente que a condição OP9-DI1 parece favorecer a proliferação/sobrevivência dos CPL em comparação com as outras condições. Mais ainda, os CPL isolados de timos E13 conseguem diferenciar-se mais eficientemente em células T do que os CPL recolhidos de timos E15.

3.6. Co-cultura de progenitores hematopoiéticos isolados de Baço E10 com a linha estromal S17 parental ou transduzida:

Na galinha, o baço apresenta um papel importante na diferenciação das células B. Pensa-se que o baço é colonizado por progenitores hematopoiéticos provenientes dos locais aórticos numa única onda de colonização perto do E3,5 (Jaffredo *et al.*, 2005b; Nagy *et al.*, 2005). É no baço que os progenitores sofrem recombinação dos genes Ig e ficam comprometidos com a linhagem B (Masteller e Thompson, 1994). Assim, isolámos do baço progenitores hematopoiéticos de forma a compreender como os diferentes ligandos de Notch afectam a especificação e diferenciação destas células.

Para o estudo da dinâmica da diferenciação dos progenitores hematopoéticos, fomos analisar a expressão do receptor Bu1a (receptor encontrado à superfície de todas as células B), da molécula KUL01 (específica de monócitos/macrófagos) e das moléculas acessórias CD4 e CD8 através de citometria de fluxo. Foi estudada a viabilidade das células através da utilização de um marcador de viabilidade – 7AAD. As células positivas para 7AAD, ou seja, as que incorporaram o 7AAD no DNA devido à membrana celular não estar íntegra, tornam-se fluorescentes e são excluídas da análise fenotípica (Modest *et al.*, 1974). Utilizámos progenitores hematopoiéticos isolados de baços com 10

dias de desenvolvimento (E10), dado que a identificação e o isolamento do rudimento do órgão assim como a obtenção de um número suficiente de progenitores necessários para a realização da experiência, revelou-se impossível para tempos anteriores a E10 (Figura 3.18).

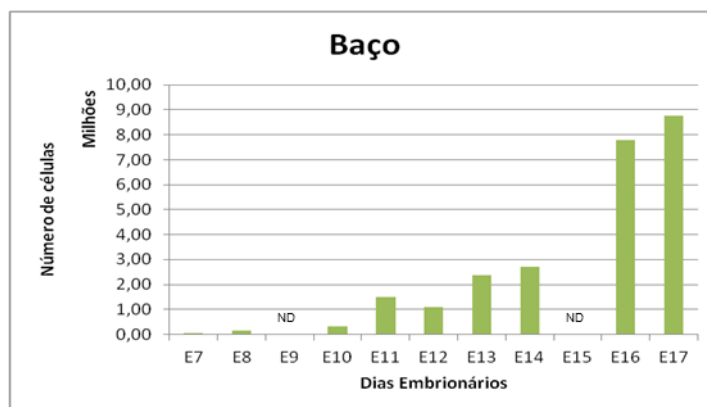


Figura 3.18. Número de células isoladas de baço ao longo do desenvolvimento embrionário (E7 – E17) da galinha. A concentração de células no baço vai subindo à medida que o tempo de desenvolvimento avança. ND – Não realizados.

Começámos por caracterizar fenotipicamente os progenitores hematopoiéticos isolados directamente dos baços E10. Verificámos que o padrão de distribuição das células pelos parâmetros FSC e SSC era heterogéneo (Figura 3.19). Através da análise do perfil morfológico é possível identificar 3 subpopulações diferentes (Figura 3.19 – A1.1, A2.1 e A3.1). Das células isoladas dos baços com 10 dias de desenvolvimento, a maioria das células das 3 subpopulações não co-expressa CD4 e CD8 (G1 apresenta 75% de células CD4⁺/CD8⁻, G2 apresenta 90% de células CD4⁺/CD8⁻ e G3 apresenta a maior percentagem de células CD4⁺/CD8⁻ - 96%). Menos de 1,5% das células de todas as subpopulações são CD4⁺/CD8⁺ (1,5%) (Figura 3.19 – B1). G2 apresenta 2% de células CD4⁺/CD8⁺ enquanto que G1 e G3 não apresentam células CD4⁺/CD8⁺ (Figura 3.19 – B1). A subpopulação 1 apresenta o maior número de células CD4⁺/CD8⁻ (23,5%) enquanto a subpopulação 2 apresenta 6% das células CD4⁺/CD8⁻ e a subpopulação 3 apresenta apenas 2% das células CD4⁺/CD8⁻ (Figura 3.19 – B). A maioria das células das 3 subpopulações é MM⁻ (a Subpopulação 1 apresenta 4,75% de células MM⁺, a subpopulação 2 apresenta 2,7% de células MM⁺ e a subpopulação 3 apresenta menos de 1% de células MM⁺). Cerca 6% das células da subpopulação 1 e 2 são Bu1a⁺ e menos de 2% das células da subpopulação 3 são Bu1a⁺ (Figura 3.19 – B2).

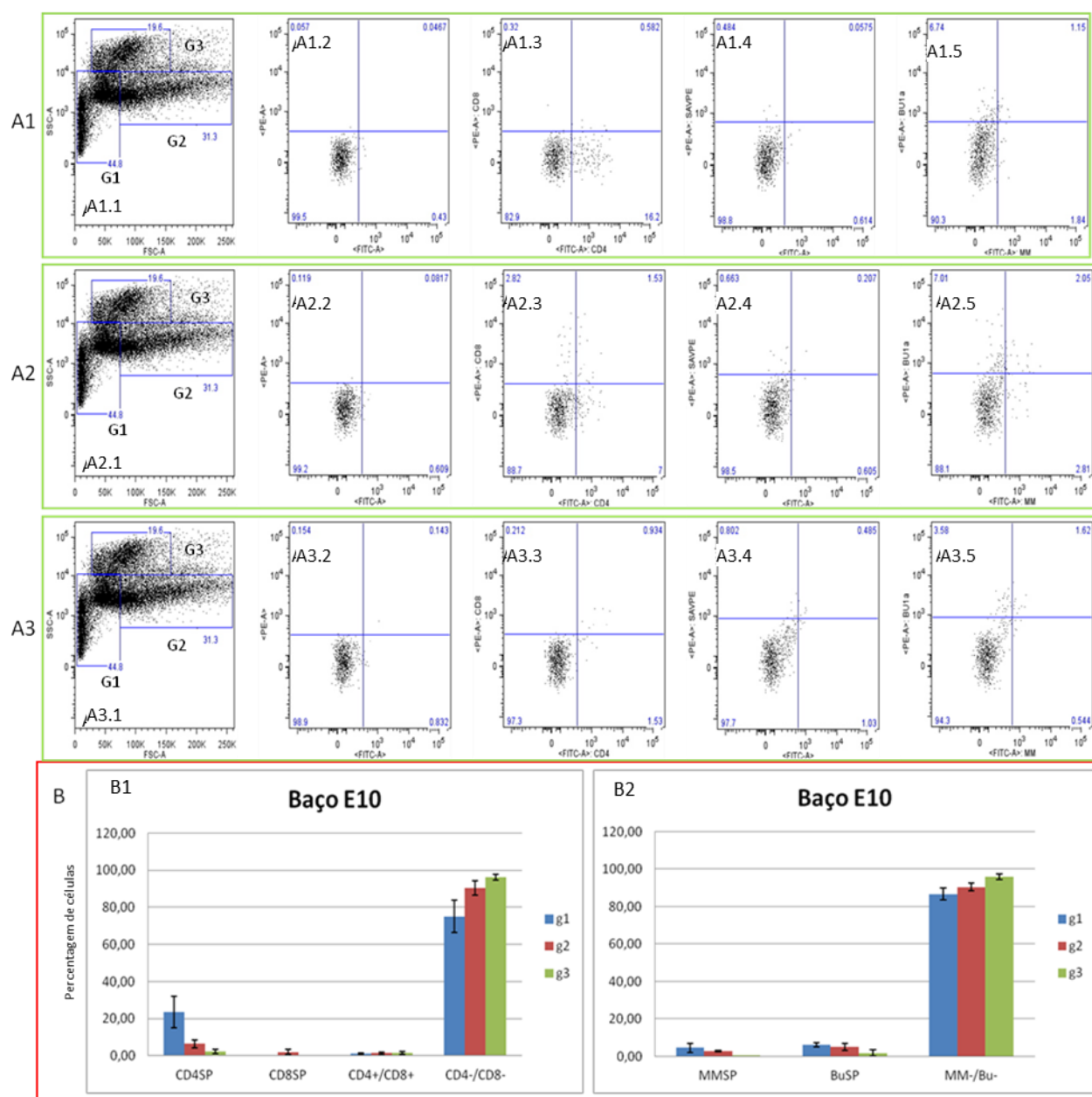


Figura 3.19. Análise fenotípica de populações de células hematopoéticas presentes no baço com 10 dias de desenvolvimento (n=3). A1 - Dot plots representativos obtidos por citometria de fluxo da população G1; A2 - Dot plots representativos obtidos por citometria de fluxo da população G2; A3 – Dot plots representativos obtidos por citometria de fluxo da população G3; A1.1, A2.1, A3.1 - Selecção das subpopulações baseada no tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC); A1.2, A1.3, A1.4, A1.5 - Análise por citometria de fluxo da expressão de CD8, CD4, MM e Bu1a na subpopulação 1 (G1); A2.2, A2.3, A2.4, A2.5 - Análise por citometria de fluxo da expressão de CD8, CD4, MM e Bu1a na subpopulação 2 (G2); A3.2, A3.3, A3.4, A3.5 - Análise por citometria de fluxo da expressão de CD8, CD4, MM e Bu1a na subpopulação 3 (G3) (painel inferior); B1 – Percentagem de células positivas para marcadores de linhagem T (CD4 e CD8); B2 - Percentagem de células positivas para marcadores de linhagem monocítica/macrofágica, (MM) e linhagem B (Bu1a).

Posteriormente as células isoladas de baços E10 foram co-cultivadas, durante 7 dias, sobre uma linha celular estromal S17 parental (S17-WT) ou transduzida com os ligandos Notch, Delta 1 ou Delta 4 (S17-DI1, S17-DI4).

Aos dias 3, 5 e 7 de co-cultura recolhemos as células em suspensão e procedemos à sua caracterização fenotípica por citometria de fluxo. Ao longo do período de co-cultura, existe um aumento do número de células do dia 0 para o dia 3 ($4,65 \times 10^5$ para $5,43 \times 10^5$ na condição S17-WT e de $4,65 \times 10^5$ para $5,25 \times 10^5$ na condição S17-DI1). No entanto, verificámos que a partir do terceiro dia de co-cultura o número de células viáveis diminui muito, tanto na condição S17-WT como na condição S17-DI1 ($5,43 \times 10^5$ para $4,4 \times 10^4$ na condição S17-WT e de $4,65 \times 10^5$ para $4,58 \times 10^4$ na condição S17-DI1). Ao dia 5, a condição a sobre-expressar DI1 apresenta um número de células ligeiramente mais elevado ($4,58 \times 10^4$) que a condição S17-WT ($4,4 \times 10^4$). Finalmente ao dia 7, o número de células viáveis aumenta ligeiramente em comparação com o dia 5 de co-cultura (aumenta de $4,4 \times 10^4$ para 6×10^4 na condição WT e aumenta de $4,58 \times 10^4$ para $5,63 \times 10^4$ na condição a sobre-expressar DI1). O número de células viáveis ao dia 7 é superior na condição S17-WT em comparação com a condição S17-DI1 (Figura 3.20).

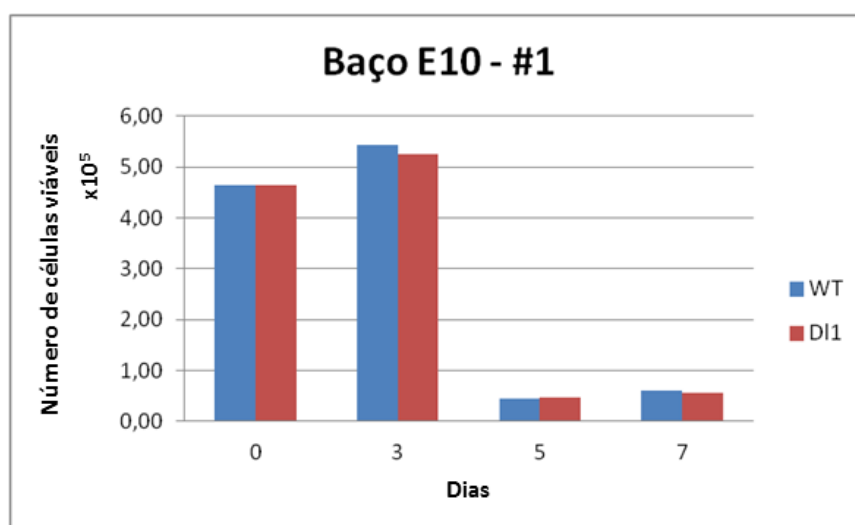


Figura 3.20. Análise da viabilidade celular das suspensões obtidas nas diferentes condições de co-cultura (S17-WT, S17-DI1) ao longo da co-cultura. O número de células viáveis aumenta do dia 0 para o dia 3 e diminui abruptamente do dia 3 para o dia 5 e apresenta um ligeiro aumento para o dia 7. Ao dia 3, a condição a sobre-expressar DI1 apresenta um número inferior de células viáveis quando comparado com a outra condição (S17-WT). Ao dia 5, a condição S17-DI1 apresenta um número superior de células que a condição S17-WT. Ao dia 7 o número de células volta a ser ligeiramente mais elevado na condição S17-WT.

Tal como verificado anteriormente, a caracterização fenotípica das células co-cultivadas com os diferentes estromas apresenta uma enorme heterogeneidade celular. É possível identificar 2 subpopulações distintas relativamente ao tamanho e complexidade celular, isto é FSC versus SSC. A subpopulação 1 (G1) é formada por células pequenas com granularidade citoplasmática reduzida, a subpopulação 2 (G2) possui células de tamanho um pouco maior que a subpopulação 1 mas de complexidade celular idêntica. Estas subpopulações sofrem alterações durante o período de co-cultura (Figura 3.21). Do dia 3 para o dia 5 de co-cultura, a subpopulação 1 aumenta em tamanho em todas as condições (na condição a sobre-expressar DI1 a subpopulação 1 aumenta de 78,6% para 89,6% e na condição aumenta S17-WT de 74% para 75,7%) (Figura 3.21). Do 5 para o 7 dia de co-cultura a subpopulação 1 apresenta uma pequena diminuição em todas as condições (de 75,6% para 74% na condição S17-WT e de 89,6% para 85,9% na condição a sobre-expressar DI1) (Figura 3.21). Ao dia 3 de co-cultura, a subpopulação 2 apresenta uma maior percentagem de células na condição S17-WT (21,2%) quando comparada com a condição S17-DI1 (17,4%) (Figura 3.21). Ao dia 5 de co-cultura, a subpopulação 2 diminuiu em todas as condições, sendo a decréscimo mais acentuado na condição a sobre-expressar DI1 (Figura 4.12). Ao dia 7, a subpopulação 2 voltou a aumentar ligeiramente em todas as condições (na condição S17-WT aumentou de 19,6% para 21,2% e na condição S17-DI1 aumentou de 7,33% para 8,14%), apresentando uma maior percentagem na condição S17-WT (Figura 3.21).

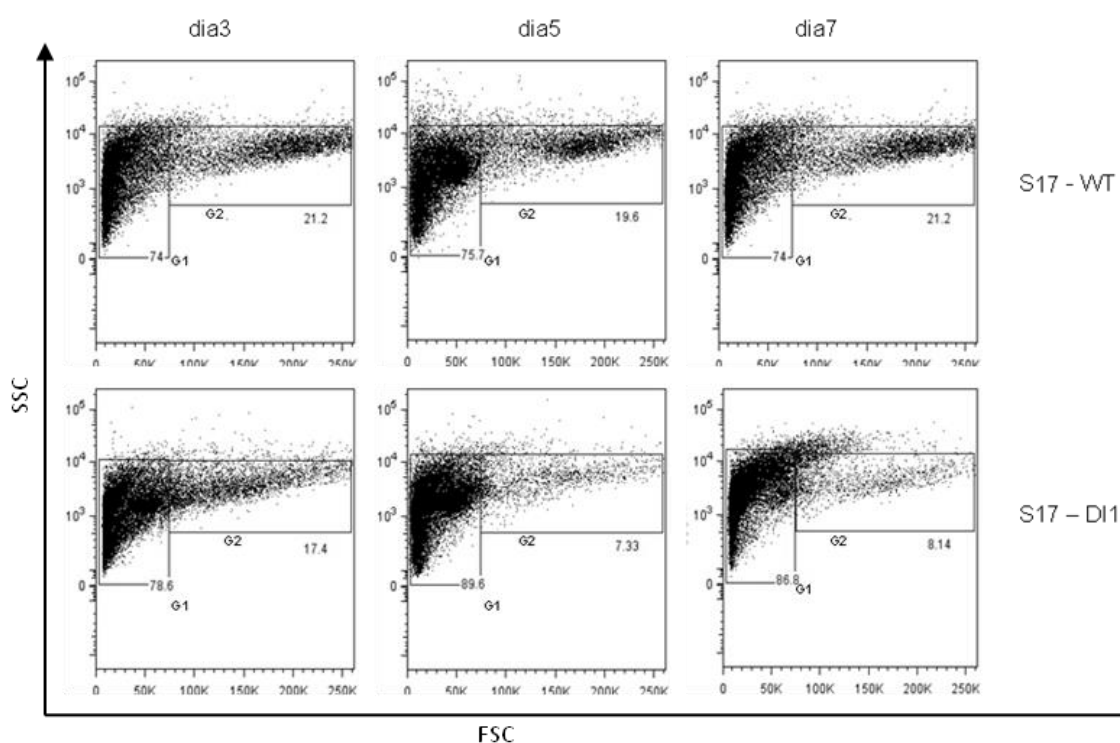


Figura 3.21. Análise por citometria dos padrões de células hematopoiéticas. Análise por citometria (parâmetros FSC e SSC) dos padrões de células hematopoiéticas co-cultivadas em células S17-WT (painel superior) e células S17-DI1 (transduzidas para sobre-expressar DI1 - painel inferior) ao longo do período de co-cultura. G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2;

A caracterização fenotípica feita por citometria de fluxo baseou-se na expressão de um painel de marcadores específicos da linhagem T (CD4, CD8) linhagem monocítica-macrofágica (MM) e de linhagem B (Bu1a) adquiridos ao longo do tempo de co-cultura. Ao terceiro dia de co-cultura, a subpopulação 1 da condição S17-WT apresentava um número de células ($8,98 \times 10^3$) que co-expressam CD4 e CD8 superior quando comparado com a condição a sobre-expressar DI1 ($3,44 \times 10^3$). A condição WT apresenta também um maior número de células $CD4^+/CD8^+$ ($9,73 \times 10^3$) do que a condição DI1 ($4,47 \times 10^3$). A subpopulação 2 da condição S17-WT apresenta um número de células que co-expressam CD4 e CD8 ($3,8 \times 10^3$) aproximadamente 4 vezes mais elevado que as células encontradas na condição S17-DI1 (1×10^3) (Figura 3.22). Apresenta também um maior número de células $CD4^+/CD8^+$ na condição S17-WT ($6,52 \times 10^3$) quando comparada com a condição S17-DI1 ($3,62 \times 10^3$). Ao dia 5 de co-cultura, a subpopulação 1 apresenta um aumento de célula $CD4^+/CD8^+$ (condição S17-WT apresenta $3,97 \times 10^4$ células e a condição S17-DI1 apresenta $2,42 \times 10^4$) e $CD4^+/CD8^+$ (condição S17-WT apresenta $4,3 \times 10^4$ células e a condição a sobre-expressar DI1 apresenta $2,4 \times 10^4$) e Bu1a⁺ (condição S17-WT apresenta $1,2 \times 10^5$ células e a condição S17-DI1 apresenta $1,39 \times 10^5$) em todas as condições, quando comparado com o dia 3 de co-cultura (Figura 3.22). Sendo que o número de células que co-expressam CD4 e CD8 e $CD4^+/CD8^+$ é superior na condição S17-WT, já o número de células Bu1a⁺ é superior na condição a sobre-expressar DI1 (Figura 3.22). Ao dia 5 de co-cultura, G2 apresenta um número de células $CD4^+/CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$ e Bu1a⁺ que aumenta em ambas as condições quando comparado com o dia 3 de co-cultura, a condição S17-WT apresenta um número mais elevado de células $CD4^+/CD8^+$ ($2,63 \times 10^4$), $CD4^+/CD8^+$ ($2,2 \times 10^4$), e Bu1a⁺ ($2,35 \times 10^4$) que a condição a sobre-expressar DI1 (Figura 3.22). Ao dia 7 de co-cultura, G1 apresenta um aumento no número de células a co-expressar CD4 e CD8 tanto na condição S17-WT ($6,16 \times 10^4$) como na condição S17-DI1 ($5,86 \times 10^4$). Apresenta também um aumento de células $CD4^+/CD8^+$, sendo o valor mais elevado encontrado na condição a sobre-expressar DI1 ($5,34 \times 10^4$) enquanto que a condição WT apresenta $2,78 \times 10^4$ células (Figura 3.22). Por outro lado, o número de células positivas para Bu1a decresce, sendo que o valor mais elevado se encontra na condição WT ($6,55 \times 10^4$) (Figura 3.22). Ao dia 7, a subpopulação 2 apresenta um maior número de células DP para CD4 e CD8 e SP para CD8 nas condições S17-WT e S17-DI1 (Figura 3.22). O número de células DP para CD4 e CD8 e SP para CD8 é mais elevado na condição S17-WT ($3,51 \times 10^4$ e $2,97 \times 10^4$, respectivamente). O número de células positivas apenas para Bu1a (Bu1a SP) aumenta na condição S17-WT ($3,94 \times 10^4$) e diminui na condição S17-DI1 ($5,49 \times 10^3$) (Figura 3.22).

Devido a limitações técnicas, os marcadores CD4 e MM só puderam ser utilizados na condição WT e ambos apresentam um aumento do número de células ao longo do tempo e co-cultura tanto em G1 como em G2 (Figura 3.22).

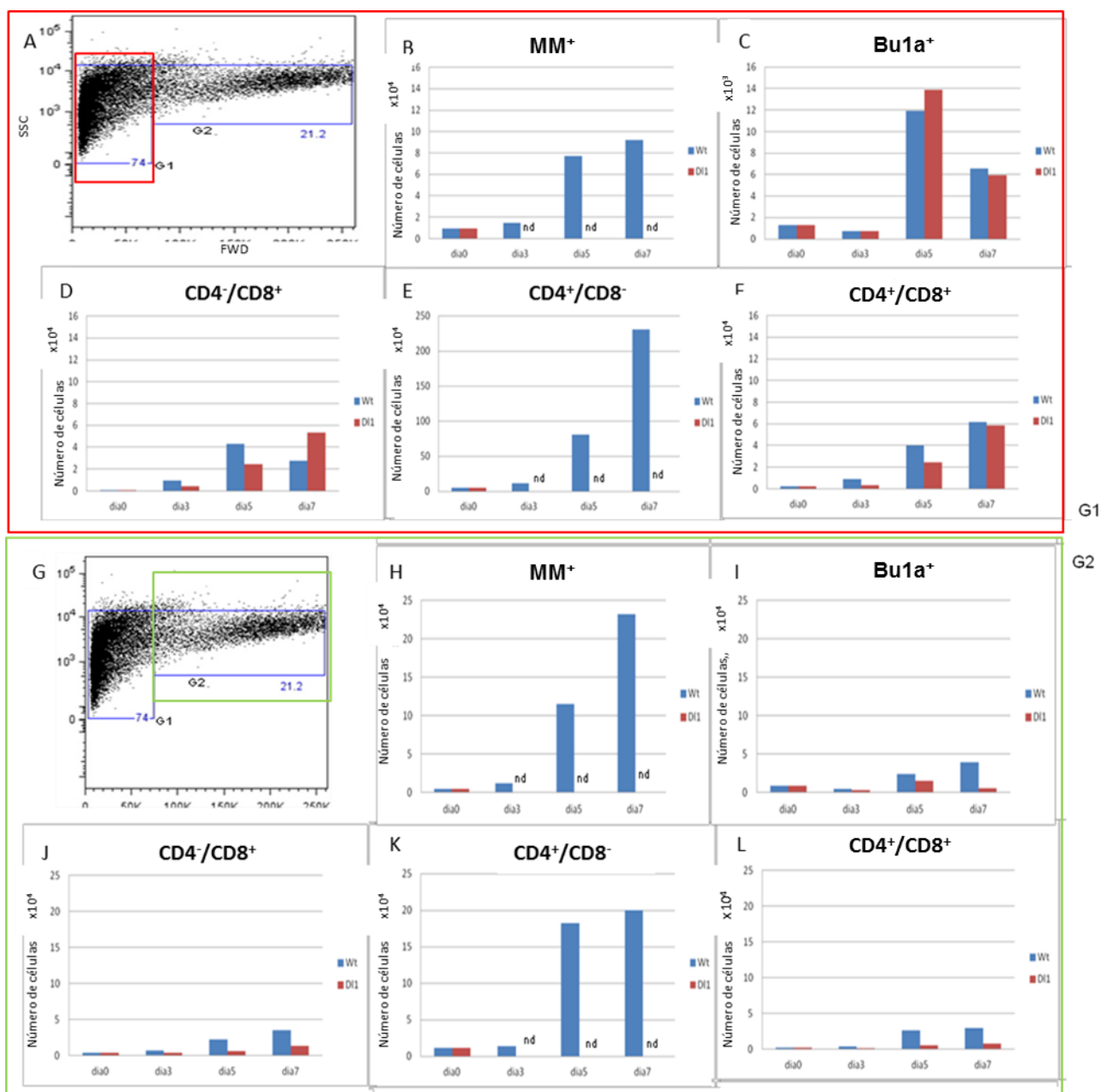


Figura 3.22. Número de células que expressam CD4, CD8, MM e Bu1a durante a experiência de co-cultura com progenitores isolados de baços com 10 dias de desenvolvimento. A e G – Perfil fenotípico de G1 e G2 (condição WT dia 3 de co-cultura); B – F – Análise por citometria da expressão de CD4, CD8, MM e Bu1a em G1 (células co-cultivadas em S17-WT, S17-DI1 durante 7 dias); H a L – Análise por citometria da expressão de CD4, CD8, MM e Bu1a em G2 (células co-cultivadas em S17-WT, S17-DI1 durante 7 dias);

Foi realizada uma segunda experiência de co-cultura as condições WT, DI1 e DI4 com células isoladas do baço com 10 dias de desenvolvimento com o objectivo de estudar as células num período de co-cultura mais longo. As células presentes no sobrenadante foram recolhidas ao dia 7 e 14 de co-cultura, posteriormente, contabilizadas e foi analisada a sua viabilidade (com a utilização de um marcador de viabilidade – 7AAD - foi possível identificar células não viáveis pois estas incorporam este marcador devido a membrana celular não estar integra – tornando-se assim fluorescente) e a expressão de alguns antígenos por citometria. O número de células desce ao longo do período de co-cultura (decrece de 5×10^5 para $1,5 \times 10^4$ nas condições WT e Ø, decrece de 5×10^5 para 8×10^4 na condição DI1 e decrece de 2×10^5 para $1,88 \times 10^4$ na condição DI4). Até ao dia 7 a condição DI1 apresenta um maior número de células quando comparada com as outras condições (Figura 3.23).

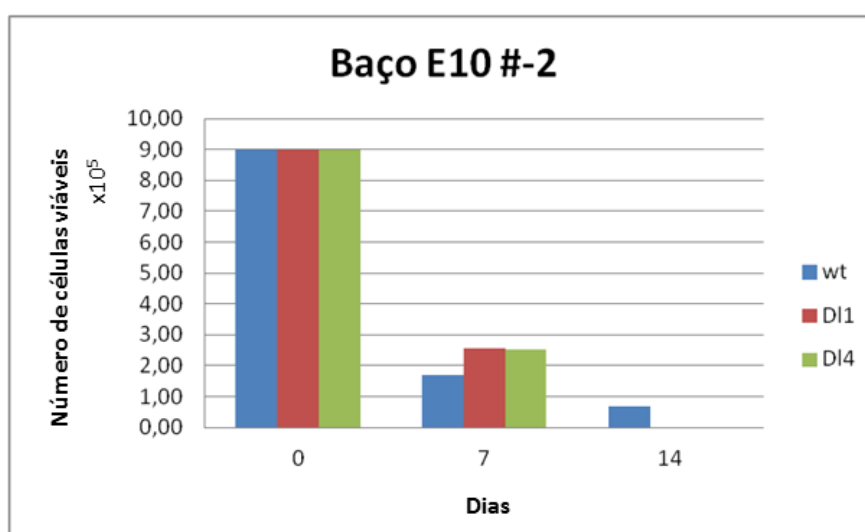


Figura 3.23. Análise da viabilidade celular das suspensões obtidas nas diferentes condições de co-cultura (WT, DI1 e DI4). O número de células decrece ao longo do tempo de co-cultura. Ao dia 7, a condição DI1 apresenta um número de células mais elevado quando comparado com as outras condições. Ao dia 7, apenas a condição WT apresenta um número residual de células.

Neste caso, parece que os estromas que sobre expressa DI1 e DI4 favorecem a proliferação /viabilidade das células. Devido a limitações técnicas relacionadas com o descolamento dos estromas DI1 e DI4 das placas de cultura, não foi possível contabilizar qualquer célula ao dia 14 de co-cultura. Pela análise dos parâmetros FSC e SSC foi possível identificar que 2 subpopulações distintas sofrem alterações durante o período de co-cultura (Figura 3.24). Tal como na primeira experiência com células do baço, ao dia 7 de co-cultura a condição WT tem uma menor percentagem de células em G1 que DI1 e DI4 e maior percentagem de células em G2 que DI1 e DI4.

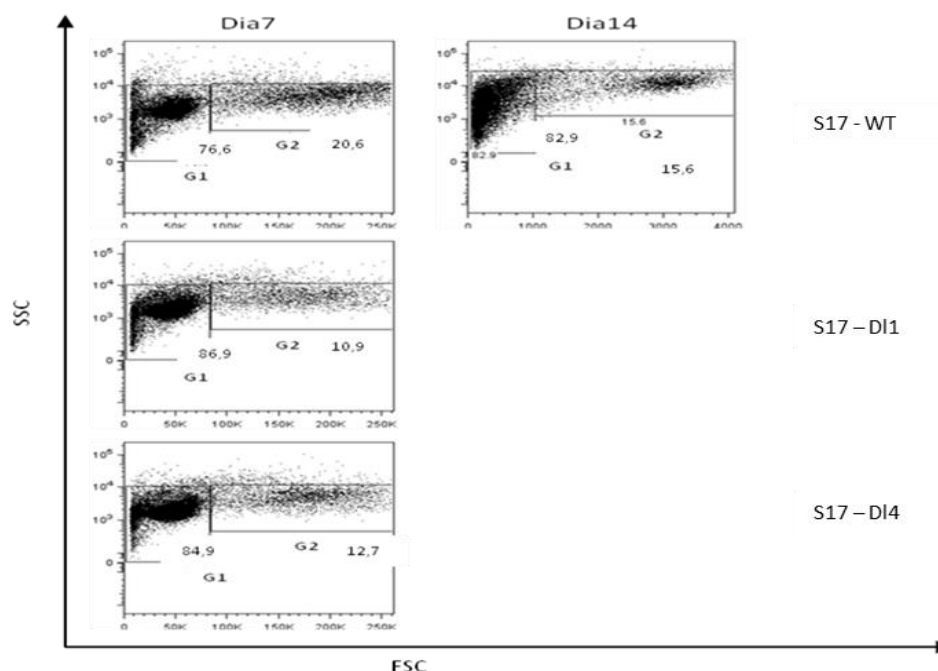


Figura 3.24. Análise por citometria dos padrões de células hematopoiéticas. Análise por citometria (parâmetros FSC e SSC) dos padrões de células hematopoiéticas co-cultivadas em células S17-WT (no topo) e células S17 – DI1 (transduzida para sobre-expressar DI1 - fundo) ao longo do período de co-cultura. G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2

Em comparação com a primeira experiência que utilizava os progenitores hematopoiéticos isolados do baço, ao sétimo dia de co-cultura a G1 apresentava um número de células que co-expressa CD4 e CD8 superior na condição DI4 ($6,62 \times 10^2$) em comparação com DI1 ($5,21 \times 10^2$). Esta segunda experiência também apresentou um maior número de células CD4⁺/CD8⁺ na condição a DI4 (1×10^3) em comparação com DI1 ($7,82 \times 10^2$) e WT (5×10^2) (Figura 3.25). A condição DI4 apresentou também um maior número de células Bu1a⁺ (2×10^3) e ao contrário do que aconteceu na primeira experiência do baço a condição DI1 apresentou um número de células Bu1a⁺ superior ($1,43 \times 10^3$) quando comparada com a condição WT (2×10^2 células) (Figura 3.25). Ao sétimo dia de co-cultura e comparando com a primeira experiência são verificamos que: G2 apresenta um número ligeiramente superior de células CD4⁺/CD8⁺ na condição DI1 ($2,22 \times 10^2$) do que a condição DI4 ($1,98 \times 10^2$); G2 apresenta um maior número de células Bu1a⁺ na condição DI4 (2×10^3) em comparação com as outras condições (Figura 3.25).

Ao dia 14 de co-cultura só foi possível realizar medições na condição S17-WT devido a limitações técnicas. A subpopulação 1 apresenta uma diminuição do número de células CD4⁺/CD8⁺ (condição S17-WT apresenta 2×10^2 células), CD4⁺/CD8⁺ (condição S17-WT apresenta $8,62 \times 10^2$ células) e apresenta um ligeiro aumento no número de células Bu1a⁺ (condição S17-WT apresenta $2,16 \times 10^2$ células), quando comparado com o dia 7 de co-cultura (Figura 3.25). Ao nível da subpopulação 2, o número de células a co-expressar CD4 e CD8, CD4⁺/CD8⁺ e Bu1a⁺ diminui do dia 7 para o dia 14 de co-cultura, apresentando os seguintes números: células CD4⁺/CD8⁺ (2×10) e CD4⁺/CD8⁺ ($1,62 \times 10$), e Bu1a⁺ (4×10) (Figura 3.25).

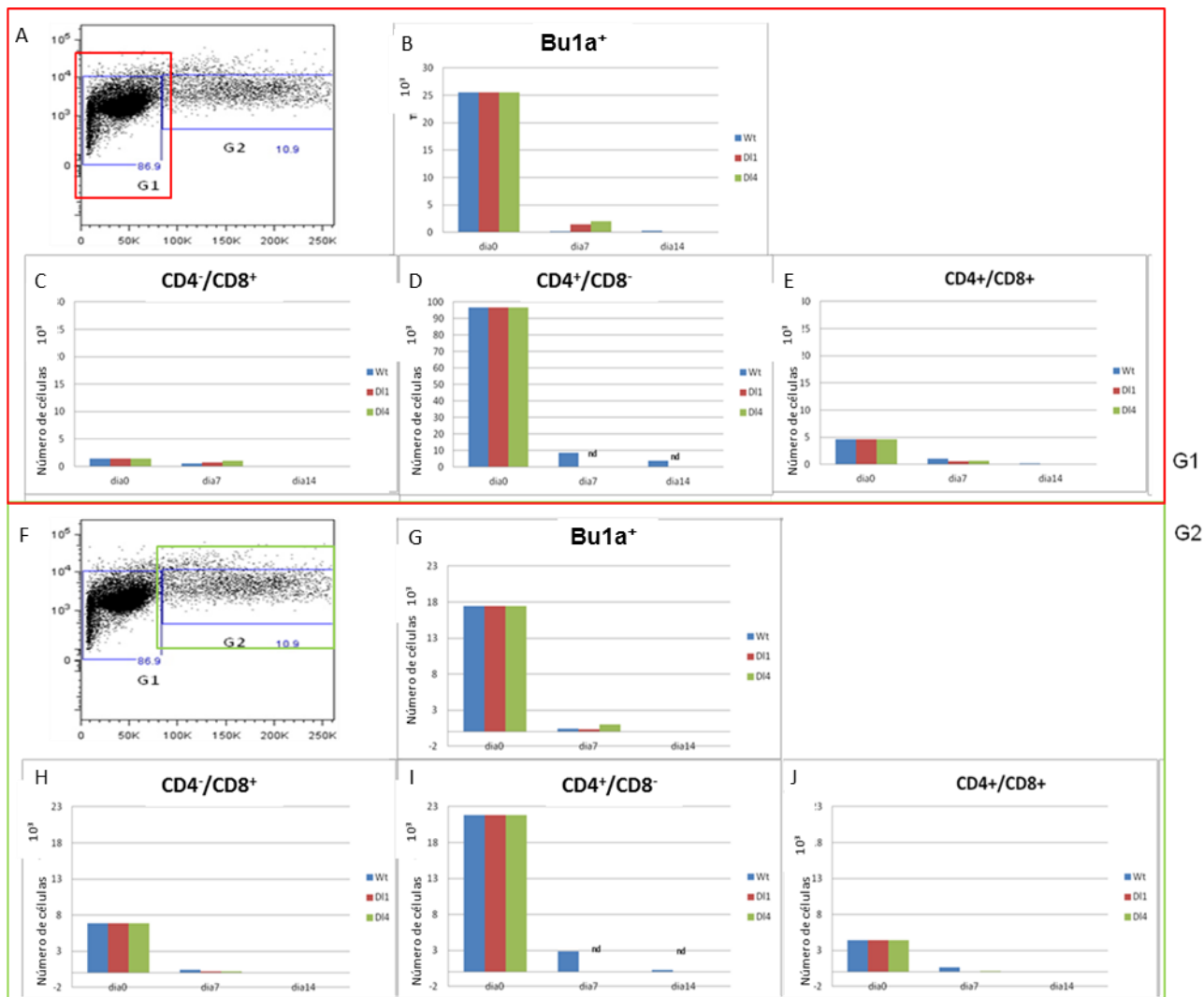


Figura 3.25. Número de células que expressam CD4, CD8 e Bu1a durante a experiência de co-cultura (#2) com progenitores isolados de baços com 10 dias de desenvolvimento. A e F – Perfil fenotípico de G1 e G2 (condição DI1 dia 7 de co-cultura); B – E – Análise por citometria da expressão de CD4, CD8 e Bu1a em G1 (células co-cultivadas em S17-WT durante 14 dias e S17-DI1, S17-DI4 durante 7 dias); G a J – Análise por citometria da expressão de CD4, CD8, MM e Bu1a em G2 (células co-cultivadas em S17-WT durante 14 dias e S17-DI1, S17-DI4 durante 7 dias);

A maioria das populações celulares recolhidas de baços com 10 dias de desenvolvimento são bastante imaturas sendo negativas para os marcadores CD4, CD8, Bu1a e MM. Em ambas as condições de co-cultura o número de células positivas para Bu1a aumenta até ao dia 5. Este resultado contraria resultados já obtidos noutros estudos, o que poderá sugerir que algo não correu como previsto durante a experiência. O número de células CD8⁺/CD4⁺ e CD8⁺/CD4⁻ aumenta em ambas as condições ao longo do tempo de co-cultura. No entanto ao longo do tempo, a condição WT aumenta o número de células CD4⁺/CD8⁻ e MM⁺.

Na segunda experiência de co-cultura o número de células decresce muito rapidamente em todas as condições. Este facto foi originado pelo descolamento das células estromais S17. Este problema técnico originou a perda de muitas células durante a co-cultura e inviabilizou a análise ao dia 14 nas condições OP9-DI1 e DI4.

CAPÍTULO 4 – Discussão:

4. Discussão:

Este trabalho teve como objectivos: 1) estudar a organogénese do timo e baço em embriões de galinha; 2) caracterizar fenotipicamente as células presentes em ambos os órgãos em estádios específicos do desenvolvimento embrionário; 3) estudar o papel da sinalização Notch na diferenciação dos progenitores hematopoiéticos isolados do timo e do baço do embrião da galinha. Para estudar a organogénese do timo e do baço, isolámos órgãos em tempos experimentais específicos. Fizeram-se cortes seriados que depois foram corados com Hematoxilina e eosina – HE) ou utilizados para imunohistoquímica. A análise dos cortes histológicos demonstrou que o baço possui muitos sinusóides desde o dia E6. Ao longo do seu desenvolvimento notou-se um aumento da presença de eritrócitos. Uma boa irrigação poderá ser importante para a sua função hematopoiética na galinha (semelhante ao fígado fetal nos mamíferos). A partir do dia E12 é possível identificar cordões de células mais basófilas na periferia do baço.

No caso do timo é possível concluir que as células da crista neural parecem não contribuir para a formação do timo até ao dia E6. O epitélio tímico apresenta diferenciação entre córtex e medula a partir do dia E8. Ao dia E14 o córtex e medula estão completamente diferenciados. É possível identificar na região medular de timos com 14 dias de desenvolvimento estruturas mais eosinófilas de maiores dimensões que correspondem aos corpúsculos de Hassall.

Para estudar a morfologia das células do timo e do baço, isolamos os mesmos em tempos experimentais específicos. Posteriormente, macerámos os órgãos para obter uma suspensão celular de células isoladas e realizámos *citospins* para estudar a morfologia das células.

A análise dos resultados obtidos da caracterização morfológica das células presentes no baço revelou que existe uma diminuição no número de células com morfologia variável. Isto poderá indicar que estas células se estão a diferenciar. Existe ainda um aumento do número de células de pequenas dimensões e sem citoplasma visível a partir de dia E10. Por outro lado, a análise dos resultados obtidos da caracterização morfológica das células presentes no timo demonstrou que existe um aumento do número de células de pequenas dimensões sem citoplasma visível ao dia E12. Ao dia E14 é possível verificar que algumas destas células de pequenas dimensões sem citoplasma visível já se começaram a diferenciar em células de pequenas dimensões com citoplasma visível.

Para estudar o papel da sinalização Notch no processo de diferenciação dos CPL extraídos do baço e do timo de embriões de galinha utilizámos um sistema *in vitro* de co-cultura, onde co-cultivamos os CPL extraídos do baço ou timo sobre uma monocamada de células estromais (S17/OP9) parental ou que expressavam diferentes ligandos Notch, DI1 ou DI4. Para caracterizar fenotipicamente as células no dia do isolamento e durante o período de co-cultura utilizamos a técnica de citometria de fluxo. A análise dos resultados obtidos das experiências de co-cultura demonstrou que o estroma que sobreexpressa DI1 parece favorecer a proliferação e/ou viabilidade dos timócitos ao longo do período de co-cultura em comparação com o estroma a sobre-expressar DI4 ou estroma WT. Mais ainda, os timos com 13 dias de desenvolvimentos apresentavam uma população de timócitos mais imatura (muitos duplos negativos para CD4 e CD8) enquanto que os timos com 15 dias de desenvolvimento apresentavam uma população mais madura (duplas positivas

para CD4 e CD8). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores realizados no nosso laboratório. Este estudo revelou ainda que, os CPL extraídos de timos com E13 (maioritariamente CD4⁺/CD8⁻) diferenciaram-se e adquiriram a co-expressão das moléculas acessórias CD4⁺/CD8⁺ durante os primeiros 3 dias de co-cultura na condição DI1 ao contrário do que acontece nas outras condições. Assim este trabalho demonstra que a condição DI1 parece favorecer a diferenciação dos CPL em detrimento das outras condições (WT e DI4).

4.1. Organogénese do timo:

Tanto na galinha como nos mamíferos, o timo é um órgão extremamente importante pois é responsável pela diferenciação T. A organogénese do timo é um processo complexo que se encontra dividido em duas fases diferentes: numa primeira fase (até ao E6) o desenvolvimento do timo é independente da colonização por CPL e numa segunda fase (a partir do E6) o desenvolvimento do timo é dependente da colonização por CPL (Nehls *et al.*, 1996; Rodewald, 2008). Estudos realizados por Le Douarin e Jotereau (1975) demonstraram que as células da crista neural só começam a contribuir para a formação da cápsula e desenvolvimento do rudimento tímico a partir do dia E6.5 (Le Douarin e Jotereau, 1975). Neste estudo confirmámos que as células da crista neural não estão presentes no timo com 6 dias de desenvolvimento.

Estudos realizados por Nehls *et al.* (1996) em ratinho revelaram que para diferenciação entre córtex e medula ficar completa é necessário ocorrer interação entre os CPL e as CET. Neste estudo demonstrámos que o epitélio tímico da galinha só inicia o processo de diferenciação (em córtex e medula) 2 dias após a primeira onda de colonização ter ocorrido e confirmámos que a partir do dia E12 a diferenciação de córtex e medula é evidente no timo de galinha. Estes dados confirmam que para a diferenciação entre córtex e medula ocorrer é necessário o timo seja colonizado por CPL.

Estudos realizados em fetos humanos demonstraram que os corpúsculos de Hassall se formam após o epitélio tímico estar diferenciado em córtex, região cortico-medular e medular (Varga *et al.*, 2010). Os nossos dados demonstram que na galinha, entre os dias E12 e E14 (já existe diferenciação entre córtex e medula), aparecem estruturas eosinófilas e com a forma de espirais concêntricas na região medular do timo que parecem assemelhar-se a corpúsculos de Hassall.

4.2. Caracterização das células presentes no timo:

Na galinha a colonização do timo ocorre através de 3 ondas de colonização diferentes: a primeira ocorre ao dia E6, a segunda ao dia E13 e a terceira ao dia E18 (Le Douarin *et al.*, 1975).

Neste estudo caracterizámos fenotipicamente as células presentes no timo (entre o dia E10 e E15). Demonstrámos que os timos com 10 dias de desenvolvimento possuem um maior número de células com um fenótipo variável. Também verificámos ao dia E12 que existe um aumento no número de células pequenas sem citoplasma e no dia E14, um aumento do número de células pequenas com citoplasma. Estes dados confirmam que ao dia E12 o timo é colonizado por progenitores linfóides (células de pequenas dimensões e sem citoplasma visível) e sugerem que ao dia E14 algumas destas células já se terão diferenciado em células de pequenas dimensões e com citoplasma visível.

Resultados obtidos anteriormente no nosso laboratório através de citometria de fluxo, demonstraram que ao dia E13 o timo possui células mais indiferenciadas que ao dia E15. Este estudo veio confirmar estes dados, pois ao dia E13 foi encontrada uma população de células CD4⁺/CD8⁻ (70% das células) maior que ao dia E15 (apenas 38% das células). Esta população mais indiferenciada que coloniza o timo ao dia E12 poderá ser importante para o processo de diferenciação do epitélio tímico.

Por outro lado ao dia E15 foi encontrada uma população células CD4⁺/CD8⁺ (41%) quando comparado com dia E13 (9%). Estes dados sugerem que a segunda onda de colonização (E12) tem um maior número de progenitores hematopoéticos e que estes originam um aumento na diferenciação de timócitos em células T. Estes dados suportam estudos anteriores do nosso laboratório em galinha e estudos anteriores em ratinho que demonstraram que a segunda onda de colonização possui CPL mais activos que a primeira onda de colonização (Nowell *et al.*, 2007).

4.3. Organogénese do baço:

Com funcionalidades parecidas com o fígado fetal dos mamíferos, o baço é um órgão importante no processo de diferenciação das células B, nas aves. Neste estudo demonstrámos que o baço fica completamente individualizado entre os dias E8 e E10.

Estudos anteriores mostraram a presença no baço de sinusóides com eritrócitos a partir do dia E5 (Fred Davison, 2008). Os nossos dados confirmam que ao dia E6 já existem vários sinusóides com eritrócitos no baço. Estes dados parecem sugerir que a boa irrigação do baço é essencial ao seu desenvolvimento e para a sua função hematopoética na galinha (a granulopoiese parece iniciar-se por volta de dia E10, a eritropoiese no baço inicia-se ao dia E10 e linfopoiese B inicia-se ao dia E3.,5-5).

Demonstrámos também que a partir do dia E12 o baço parece possuir uma cápsula mais definida e uma estrutura mais densa. Estes dados parecem estar de acordo com estudos anteriores em galinha, que demonstram que a partir do dia E11 começa a formar-se uma rede de fibras de colagénio no baço (Fukuta e Mochizuki, 1982; Yassine *et al.*, 1989).

Estudos em codorniz revelaram que o processo de granulopoiese no baço começa entre o dia E11 e o dia E14 com a formação de pequenas ilhas de células muito basófilas (Payne, 1971; Liman e bayram, 2011). Neste estudo foram encontrados cordões de células semelhantes aos dias E12 e E14 aos encontrados em codorniz, isto sugere que a granulopoiese começa a partir do dia E10 (Payne, 1971).

Estudos anteriores realizados por Romanoff (1960) demonstraram que as artérias só ficam visíveis no baço a partir de dia E12. Os resultados obtidos neste estudo também apontam neste sentido, pois só a partir de E12 é que é possível identificar a artéria no baço. O facto de a artéria só ser visível ao dia E12 poderá estar relacionado com o início da granulopoiese e eritropoiese que se iniciam por volta do dia E10. Estas evidências reforçam a função hematopoiética do baço, possuindo papéis importantes na eritropoiese, linfopoiese B e granulopoiese.

Estudos realizados em codorniz revelaram que a diferenciação em polpa vermelha e polpa branca só acontece após o nascimento (Liman e bayram, 2011). Neste estudo não foi possível verificar qualquer diferenciação entre polpa vermelha e polpa branca, o que sugere que tal como na codorniz a diferenciação entre polpa vermelha e polpa branca na galinha só acontece após dia E14. Seria interessante no futuro estudar baços com mais dias de desenvolvimento embrionário para identificar o período de diferenciação da polpa vermelha e polpa branca através de imunohistoquímica ou de uma Coloração histológica clássica.

4.4. Caracterização das células presentes no baço:

É sabido que o baço é colonizado por CEH entre o dia E3,5-E5 provenientes da região aórtica, no entanto serão necessários mais estudos para clarificar o assunto (Jaffredo *et al.*, 2005b; Nagy *et al.*, 2005). Neste estudo procurámos caracterizar fenotipicamente as células presentes no baço (entre o dia E8 e E14) e demonstramos que os baços com 10 dias de desenvolvimento possuem um maior número de células com um fenótipo variável.

A partir do dia E10 o número de células de pequenas dimensões e sem citoplasma visível. Este resultado poderá reflectir a chegada da segunda onda de colonização proveniente dos focos para-aórticos que se inicia por volta do dia E9.

4.5. OP9-DI1 suporta a diferenciação dos CPL em células T:

A sinalização Notch é uma peça fundamental no processo de diferenciação dos CPL (Jaleco *et al.*, 2001). Estudos revelaram que a co-cultura de CPL sobre células estromais OP9/S17 favorecia a diferenciação B (Rawlings *et al.*, 1995). Por outro lado, estudos realizados por Jaleco e colegas revelaram que a co-cultura de células sobre uma monocamada de células estromais (OP9/S17) a sobre-expressar DI1 leva ao bloqueio da diferenciação dos CPL em células B e à sua diferenciação em células T (Jaleco *et al.*, 2001). Assim, fomos utilizar dois sistemas *in vitro*, um descrito por Jaleco e colegas (S17) e outro descrito por Zuniga-Pflucker e colegas (OP9). Ambos os sistemas fazem uso de linhas celular estromais de ratinho transduzidas com vectores para expressar os diferentes ligandos da sinalização Notch (Jaleco *et al.*, 2001; Schmitt e Zuniga-Pflucker, 2002).

Estudos realizados por Schmitt e Zuniga-Pflucker (2002) demonstraram que células extraídas de timos de ratinho (CPL) só eram capazes de sobreviver e proliferar em cultura quando cultivadas com inter-leucina 7. Neste estudo verificámos que os CPL co-cultivados sobre qualquer estroma vão morrendo ao longo do tempo. Isto significa que as células estão em sofrimento e factores adicionais podem ser necessários para os CPL sobreviverem. Assim, seria interessante otimizar o sistema experimental no futuro, para entender melhor o que acontece em termos de proliferação/sobrevivência nas diferentes condições.

Apesar de as células estarem em sofrimento, é possível verificar que a condição OP9-DI1 parece favorecer a sobrevivência/proliferação dos CPL em comparação com a condição OP9-DI4. Estes dados demonstram que na galinha, tal como em estudos anteriores conduzidos por Schmitt e Zuniga-Pflucker (2002) em ratinho, a condição DI1 favorece a diferenciação dos CPL em células T *in vitro*. Por outro lado estes resultados parecem contrariar estudos realizados em ratinho (*in vivo*), onde se demonstrou que DI4 seria mais importante para a diferenciação T (Koch *et al.*, 2008). Mais ainda, o nosso estudo demonstrou que a condição OP9-DI1 favorece a diferenciação dos CPL (principalmente em CPL isolados timo com E13) em células T em comparação com a condição OP9-DL4. Isto pode significar que pelo menos durante o desenvolvimento da galinha DI1 poderá ter um papel mais preponderante que DI4, estimulando a proliferação, sobrevivência e diferenciação T.

Estudos anteriores realizados com células de ratinho demonstraram que o aparecimento de um elevado número de células T na condição OP9-DI1 parecia ser devido à diferenciação de progenitores multipotentes e não devido à diferenciação de células pré-especificadas na linhagem T (Kawamoto *et al.*, 1999). A análise dos resultados das co-culturas com timócitos de E15 parece suportar estes dados pois a condição OP9-DI1 não consegue promover tanta proliferação/sobrevivência como nas co-culturas de E13. Mais ainda, a diferença entre a condição OP9-DI1 e OP9-DI4 é muito ligeira e todas as condições de co-cultura de células de timos E15 apresentavam células uma intensidade média de fluorescência superior do que na experiência de dia E13. Estes dados demonstram que as células recolhidas das co-culturas E15 eram mais maduras e poderão não possuir uma capacidade de responder a estímulos externos tão elevada como as células recolhidas de timos 13 dias de desenvolvimento.

Neste estudo foi impossível estudar a expressão células que expressem apenas CD4 devido a não ser possível distinguir o estroma que expressa GPF das células positivas para CD4 – FITC

devido a emitirem fluorescência no mesmo canal (primeiro canal de fluorescência – Verde). Assim, para tentarmos resolver esta questão poderíamos utilizar um anticorpo CD45 para identificar células hematopoiéticas e assim descartar da análise as células do estroma. Apesar de todas as nossas tentativas para otimizar o protocolo de utilização dos anticorpos, estes nunca funcionaram correctamente. Devido a esta limitação foi impossível analisar a expressão de CD4.

Seria muito importante no futuro testar outros anticorpos, anti-CD45 ou anti-CD4 (que emita fluorescência noutro canal) para podermos analisar a expressão de CD4 ao longo do desenvolvimento.

Foram realizadas também experiências com células extraídas do baço com objectivo de isolar progenitores que nunca tivessem sofrido contacto com o epitélio tímico. Utilizamos o baço devido a sua função no sistema imunitário das aves (diferenciação B). Além disso, o baço é o órgão onde seria mais provável encontrar progenitores hematopoiéticos em maior quantidade.

No caso da primeira experiência com células extraídas do baço, vimos que as células isoladas de baços com 10 dias de desenvolvimento são negativas para todos os marcadores estudados. Durante o período de co-cultura existe um aumento de células que expressam CD4 ou MM na condição WT. Seria extremamente interessante estudar o que acontece na condição S17-DI1/DI4 ao longo do tempo de co-cultura.

Estudos revelaram que o estroma S17-WT (células estromais de medula óssea sem serem transduzidas) favorece a diferenciação B (Rawlings *et al.*, 1995). Foi detectada um aumento de células B (Bu1a positivas) tanto na condição S17-WT e S17-DI1 ao longo do tempo. Dados de artigos já publicados, demonstraram em mamíferos que S17-DI1 bloqueia a diferenciação B (Jaleco *et al.*, 2001). Neste trabalho tal não se verificou o que poderá ser explicado com o facto de estarmos a estudar progenitores hematopoiéticos de aves. Assim mais estudos serão necessários para compreender estas diferenças.

Seria interessante no futuro utilizar baços e timos mais novos ou isolar progenitores totalmente indiferenciados da região da aorta. Assim, seria possível analisar o efeito da sinalização Notch na modulação da decisão celular no processo de linfopoiese.

Na segunda experiência com CPL isolados de baços, todas as condições apresentaram um grande decréscimo no número de células devido a problemas com o descolamento dos estromas. O facto de os estromas terem descolado originou a perda de um grande número de células em todas as condições. Assim numa próxima experiência com estroma S17 seria importante otimizar as condições de co-cultura. Assim, ao dia 14 de co-cultura foi impossível obter células as condições S17-DI1 e S17-DI4. Mais ainda, os resultados da diferenciação dos CPL foram diferentes em comparação com a primeira experiência. Isto deveu-se principalmente devido ao descolamento dos estromas S17 e à perda de um grande número de CPL.

Seria interessante no futuro analisar o processo de diferenciação dos TCR em co-cultura para verificar se DI1 ou DI4 afectam o desenvolvimento dos TCR.

CAPÍTULO 5 – Conclusão:

5. Conclusão:

Neste trabalho procurámos compreender melhor a organogénese de dois órgãos linfóides, o baço e o timo, bem como as populações celulares neles presentes ao longo do desenvolvimento embrionário da galinha. A organogénese do baço inicia-se pelo dia E6, apresentando-se como um divertículo bastante irrigado e com inúmeros sinusóides. Este divertículo só fica individualizado entre o dia E8 e E10. Nos estádios mais precoces do desenvolvimento, o baço é constituído por células de morfologia heterogénea. Ao dia E10 predominam células sem expressão de marcadores de linhagem B e monocítica no entanto existe uma pequena fracção celular que expressa CD4. Posteriormente a este estágio, aumenta o número de células de pequenas dimensões e sem citoplasma visível. Isto poderá ser explicado pelo início da segunda onda de colonização do baço por progenitores vindos da região aórtica. Verificámos igualmente que a sinalização Notch não parece afectar distintamente o potencial de diferenciação dos progenitores hematopoiéticos presentes em baços E10. A não identificação de regiões de polpa branca e vermelha até ao dia E14 sugere que estas apareçam posteriormente.

Em relação à organogénese do timo, confirmámos que as células da crista neural parecem não contribuir para a sua formação até ao dia E6. Entre os dias E8 e E10 as CET começam a diferenciar-se em cCET e mCET, promovidas pela interacção entre os CPL da primeira onda de colonização e o epitélio do rudimento tímico. Neste estágio o timo é constituído predominantemente por células indiferenciadas. Confirmámos por análise de citometria de fluxo que o timo sofre a segunda onda de colonização ao dia E12. Ao dia E14, alguns CPL começam-se a diferenciar em células T. Também neste dia é possível encontrar os corpúsculos de Hassall na região medular do timo. Verificámos que células isoladas de timos E13 respondem diferencialmente a microambientes com sinalização Notch activa. Co-culturas de progenitores hematopoiéticos com estromas a sobre-expressar DI1 apresentavam índices mais elevados de proliferação/sobrevivência dos CPL em relação às outras condições estudadas. Mais ainda, as células isoladas de timos E13 parecem possuir um potencial de diferenciação superior em relação às células recolhidas de timos E15 para responder a estímulos externos. De facto, timos E13 apresentam células mais indiferenciadas do que timos E15.

Concluindo, o desenvolvimento de órgãos e células linfóides é um processo complexo e extenso que envolve o tráfico e a interacção de progenitores hematopoiéticos entre diferentes regiões anatómicas e os rudimentos dos órgãos linfóides. Os nossos resultados parecem sugerir que a sinalização Notch desempenha um papel importante para a expansão/diferenciação de progenitores linfóides do timo.

5.1. Perspectivas Futuras:

Seria interessante caracterizar a expressão dos ligandos da sinalização Notch (principalmente DI1 e DI4) durante a organogénese do timo da galinha.

No futuro poderíamos utilizar baços e timos mais novos ou isolar progenitores totalmente indiferenciados da região da aorta para realizar ensaios de co-cultura com estromas a expressar DI1.

Assim seria possível analisar melhor o seu potencial de diferenciação em células T. Outro ponto importante a investigar é a expressão dos TCR ao longo da maturação dos timócitos para entender melhor a relação entre os diferentes TCR e as moléculas acessórias: CD4 e CD8 e o co-receptor CD3. Poderíamos ainda utilizar técnicas de imunohistoquímica para identificar a rota de diferenciação dos CPL desde que entram no timo até ao final da sua maturação. Bem como a caracterização da expressão dos diferentes ligandos da sinalização Notch (especialmente DI1 e DI4) durante o desenvolvimento do timo da galinha. Seria importante ver como se comporta a diferenciação dos TCR ao longo do período de co-cultura para perceber se serão afectados pelos estromas OP9-DI1/DI4. Seria interessante otimizar o sistema de co-culturas de maneira a evitar a morte celular observada.

Por fim, podíamos co-cultivar os CPL extraídos do baço e verificar se os resultados obtidos neste trabalho se mantêm ou se existiu algum problema com o sistema de co-culturas.

Referências:

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., e Pillai, S.** (2007). Cellular and molecular immunology (Saunders Elsevier).
- Alves, N.L., Huntington, N.D., Rodewald, H.R., e Di Santo, J.P.** (2009). Thymic epithelial cells: the multi-tasking framework of the T cell "cradle". *Trends in immunology* 30, 468-474.
- Anderson, G., e Jenkinson, E.J.** (2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nature reviews Immunology* 1, 31-40.
- Arakawa, H., Hauschild, J., e Buerstedde, J.M.** (2002). Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science (New York, NY)* 295, 1301-1306.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., e Fortini, M.E.** (1995). Notch signaling. *Science (New York, NY)* 268, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., e Lake, R.J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, NY)* 284, 770-776.
- Benatar, T., Tkalec, L., e Ratcliffe, M.J.** (1992). Stochastic rearrangement of immunoglobulin variable-region genes in chicken B-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7615-7619.
- Bleul, C.C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J.S., e Boehm, T.** (2006). Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 441, 992-996.
- Bourikas, D., e Stoeckli, E.T.** (2003). New tools for gene manipulation in chicken embryos. *Oligonucleotides* 13, 411-419.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., e Goodman, M.F.** (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4102-4107.
- Bray, S.J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 678-689.
- Brend, T., e Holley, S.A.** (2009). Expression of the oscillating gene *her1* is directly regulated by *Hairy/Enhancer of Split*, *T-box*, and *Suppressor of Hairless* proteins in the zebrafish segmentation clock. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 2745-2759.
- Caprioli, A., Minko, K., Drevon, C., Eichmann, A., Dieterlen-Lievre, F., e Jaffredo, T.** (2001). Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Developmental biology* 238, 64-78.
- Ciriaco, E., Piñera, P.P., Díaz-Esnal, B., e Laurà, R.** (2003). Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microscopy Research and Technique* 62, 482-487.
- Coltey, M., Jotereau, F.V., e Le Douarin, N.M.** (1987). Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus. *Cell differentiation* 22, 71-82.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., e Papavasiliou, F.N.** (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *The Journal of experimental medicine* 197, 1291-1296.
- Dieterlen-Lievre, F.** (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *Journal of embryology and experimental morphology* 33, 607-619.
- Dieterlen-Lievre, F., e Martin, C.** (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. *Developmental biology* 88, 180-191.
- Dieterlen-Lievre, F. (1988). Invertebrate blood cells. In *Invertebrate blood cells*, N.Y.C.U. Press, ed., p. 257±336.
- Dieterlen-Lievre, F., e Le Douarin, N.M.** (2004). From the hemangioblast to self-tolerance: a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mechanisms of development* 121, 1117-1128.
- Douarin, N.L., e McLaren, A.** (1984). *Chimeras in developmental biology* (Academic Press).
- Douarin, N.L., e Kalcheim, C.** (1999). *The Neural Crest* (Cambridge University Press).
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., e Sklar, J.** (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-661.

- Felli, M.P., Maroder, M., Mitsiadis, T.A., Campese, A.F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R.S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A., et al.** (1999). Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int Immunol* 11, 1017-1025.
- Figueiredo, M.** (2011). The role of Notch signaling in thymic epithelium development. In *Institute Histology and Development Biology* (Universidade de Lisboa).
- Fred Davison, B.K., Karel A. Schat** (2008). *Avian Immunology*, Vol First edition, first edition edn (Academic Press: Elsevier).
- Fukuta, K., e Mochizuki, K.** (1982). Formation of reticular fibers in the developing spleen of the chick embryo. *Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku* 45, 181-189.
- Funk, P.E., e Palmer, J.L.** (2003). Dynamic control of B lymphocyte development in the bursa of fabricius. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 51, 389-398.
- Garg, V., Muth, A.N., Ransom, J.F., Schluterman, M.K., Barnes, R., King, I.N., Grossfeld, P.D., e Srivastava, D.** (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437, 270-274.
- Glick, B.** (1983). Bursa Fabricius. *Avian Biology* 7, 443-450.
- Glick, B.** (1991). Historical perspective: the bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present. *Vet Immunol Immunopathol* 30, 3-12.
- Gordon, J., Bennett, A.R., Blackburn, C.C., e Manley, N.R.** (2001). Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch. *Mechanisms of development* 103, 141-143.
- Gordon, J., e Manley, N.R.** (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development* 138, 3865-3878.
- Gordon, W.R., Arnett, K.L., e Blacklow, S.C.** (2008). The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *Journal of cell science* 121, 3109-3119.
- Guiu, J., Shimizu, R., D'Altri, T., Fraser, S.T., Hatakeyama, J., Bresnick, E.H., Kageyama, R., Dzierzak, E., Yamamoto, M., Espinosa, L., et al.** (2013). Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *The Journal of experimental medicine* 210, 71-84.
- Gunther, T., Chen, Z.F., Kim, J., Priemel, M., Rueger, J.M., Amling, M., Moseley, J.M., Martin, T.J., Anderson, D.J., e Karsenty, G.** (2000). Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* 406, 199-203.
- Hamburger, V., e Hamilton, H.L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88, 49-92.
- Hamburger, V., e Hamilton, H.L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. In *Developmental dynamics*, P.B. Antin, ed. (Wiley-Liss, INC.), pp.:231-272.
- Han, W., Ye, Q., e Moore, M.A.** (2000). A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95, 1616-1625.
- Heinzel, K., Benz, C., e Bleul, C.C.** (2007). A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8421-8426.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., e Ish-Horowicz, D.** (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Houssaint, E., Belo, M., e Le Douarin, N.M.** (1976). Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Developmental biology* 53, 250-264.
- Hozumi, K., Negishi, N., Tsuchiya, I., Abe, N., Hirano, K., Suzuki, D., Yamamoto, M., Engel, J.D., e Habu, S.** (2008). Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *European journal of immunology* 38, 977-985.
- Jaffredo, T., Bollerot, K., Sugiyama, D., Gautier, R., e Drevon, C.** (2005a). Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *The International journal of developmental biology* 49, 269-277.
- Jaffredo, T., Fella, J.S., e Dunon, D.** (2005b). *Immunology of Birds and Reptiles*. Encyclopedia of life Science.
- Jaleco, A.C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., e Parreira, L.** (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *The Journal of experimental medicine* 194, 991-1002.

- Jameson, S.C., Hogquist, K.A., e Bevan, M.J.** (1995). Positive selection of thymocytes. *Annual review of immunology* 13, 93-126.
- Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., Rossi, S.W., e Anderson, G.** (2006). The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nature reviews Immunology* 6, 551-555.
- John, J.L.** (1994). The avian spleen: a neglected organ. *The Quarterly review of biology* 69, 327-351.
- Jotereau, F., Heuze, F., Salomon-Vie, V., e Gascan, H.** (1987). Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration. *Journal of immunology* 138, 1026-1030.
- Jotereau, F.V., e Le Douarin, N.M.** (1978). The development relationship between osteocytes and osteoclasts: a study using the quail-chick nuclear marker in endochondral ossification. *Developmental biology* 63, 253-265.
- Jotereau, F.V., e Le Douarin, N.M.** (1982). Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte precursor cells in the quail thymus during embryonic and perinatal life. *Journal of immunology* 129, 1869-1877.
- Kawamoto, H., Ohmura, K., Fujimoto, S., e Katsura, Y.** (1999). Emergence of T cell progenitors without B cell or myeloid differentiation potential at the earliest stage of hematopoiesis in the murine fetal liver. *Journal of immunology* 162, 2725-2731.
- Kendall, M.D.** (1980). Avian thymus glands: a review. *Developmental and comparative immunology* 4, 191-209.
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., Macdonald, H.R., e Radtke, F.** (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *The Journal of experimental medicine* 205, 2515-2523.
- Kohonen, P., Nera, K.P., e Lassila, O.** (2007). Avian model for B-cell immunology--new genomes and phylotranscriptomics. *Scandinavian journal of immunology* 66, 113-121.
- Konig, R., Shen, X., e Germain, R.N.** (1995). Involvement of both major histocompatibility complex class II alpha and beta chains in CD4 function indicates a role for ordered oligomerization in T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 182, 779-787.
- Kubota, T., Wang, J., Gobel, T.W., Hockett, R.D., Cooper, M.D., e Chen, C.H.** (1999). Characterization of an avian (*Gallus domesticus*) TCR alpha delta gene locus. *Journal of immunology* 163, 3858-3866.
- Lai, E.C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131, 965-973.
- Larijani, M., Frieder, D., Basit, W., e Martin, A.** (2005). The mutation spectrum of purified AID is similar to the mutability index in Ramos cells and in ung(-/-)msh2(-/-) mice. *Immunogenetics* 56, 840-845.
- Le Douarin, N.M.** (1967). Détermination précoce des ébauches de la thyroïde et du thymus chez l'embryon de Poulet. . *CR Acad Sci* 264, 940-942.
- Le Douarin, N.M., Bussonnet, C., e Chaumont, F.** (1968). Etude des capacités de différenciation et du rôle morphogène de l'endoderme pharyngien chez l'embryon d'Oiseau. *Ann Embryol Morph* 1, 29-40.
- Le Douarin, N.M., Houssaint, E., Jotereau, F.V., e Belo, M.** (1975). Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 2701-2705.
- Le Douarin, N.M., e Jotereau, F.V.** (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *The Journal of experimental medicine* 142, 17-40.
- Le Douarin, N.M., Dieterlen-Lievre, F., e Oliver, P.D.** (1984). Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *The American journal of anatomy* 170, 261-299.
- Lehmann, R., Jiménez, F., Dietrich, U., e Campos-Ortega, J.** (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux' Archiv* 192, 62-74.
- Lewis, J., Hanisch, A., e Holder, M.** (2009). Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *Journal of biology* 8, 44.
- Liman, N., e bayram, G.K.** (2011). Structure of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) spleen during pre-and post-hatching periods. *Revue Méd Vét*, 162, 25-33.
- Litman, G.W., Anderson, M.K., e Rast, J.P.** (1999). Evolution of antigen binding receptors. *Annual review of immunology* 17, 109-147.

- Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G.A., et al.** (2005). The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymus. *Blood* 105, 31-39.
- Mancini, S.J., Mantei, N., Dumortier, A., Suter, U., MacDonald, H.R., e Radtke, F.** (2005). Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* 105, 2340-2342.
- Masteller, E.L., e Thompson, C.B.** (1994). B cell development in the chicken. *Poult Sci* 73, 998-1011.
- Masteller, E.L., Larsen, R.D., Carlson, L.M., Pickel, J.M., Nickoloff, B., Lowe, J., Thompson, C.B., e Lee, K.P.** (1995a). Chicken B-Cells Undergo Discrete Developmental-Changes in Surface Carbohydrate Structure That Appear to Play a Role in Directing Lymphocyte Migration during Embryogenesis. *Development* 121, 1657-1667.
- Masteller, E.L., Lee, K.P., Carlson, L.M., e Thompson, C.B.** (1995b). Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation. *Journal of immunology* 155, 5550-5556.
- Michael, J.H., Ratcliffe** (2002). B cell development in gut associated lymphoid tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87, 337-340.
- Miller, J.F.A.P.** (1961). Immunological function of the thymus. *The Lancet* 278, 748-749.
- Moore, M.A., e Owen, J.J.** (1965). Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. *Nature* 208, 956 passim.
- Moore, M.A., e Owen, J.J.** (1967). Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* 215, 1081-1082.
- Morgan, T.** (1917). The theory of the gene. *Am Nat* 51, 513-544.
- Morimura, T., Miyatani, S., Kitamura, D. and Goitsuka, R.** (2001). Notch Signaling Suppresses IgH Gene Expression in Chicken B Cells: Implication in Spatially Restricted Expression of Serrate2/Notch1 in the Bursa of Fabricius1. *J Immunol* 201 166, 3277-3283.
- Mumm, J.S., e Kopan, R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Developmental biology* 228, 151-165.
- Murray, P.D.F.** (1932). The Development in vitro of the Blood of the Early Chick Embryo. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 111, 497-521.
- Nagy, N., Biro, E., Takacs, A., Polos, M., Magyar, A., e Olah, I.** (2005). Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 232, 55-66.
- Nagy, N., e Olah, I.** (2010). Experimental evidence for the ectodermal origin of the epithelial anlage of the chicken bursa of Fabricius. *Development* 137, 3019-3023.
- Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H., e Boehm, T.** (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372, 103-107.
- Nehls, M., Kyewski, B., Messerle, M., Waldschutz, R., Schuddekopf, K., Smith, A.J., e Boehm, T.** (1996). Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science (New York, NY)* 272, 886-889.
- Neves, H., Weerkamp, F., Gomes, A.C., Naber, B.A., Gameiro, P., Becker, J.D., Lucio, P., Clode, N., van Dongen, J.J., Staal, F.J., et al.** (2006). Effects of Delta1 and Jagged1 on early human hematopoiesis: correlation with expression of notch signaling-related genes in CD34+ cells. *Stem cells* 24, 1328-1337.
- Neves, H., Dupin, E., Parreira, L., e Le Douarin, N.M.** (2012). Modulation of Bmp4 signalling in the epithelial-mesenchymal interactions that take place in early thymus and parathyroid development in avian embryos. *Developmental biology* 361, 208-219.
- Nowell, C.S., Farley, A.M., e Blackburn, C.C.** (2007). Thymus organogenesis and development of the thymic stroma. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 380, 125-162.
- Olah, I., Glick, B., e Toro, I.** (1986). Bursal development in normal and testosterone-treated chick embryos. *Poult Sci* 65, 574-588.
- Ong, C.T., Cheng, H.T., Chang, L.W., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Stormo, G.D., e Kopan, R.** (2006). Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *The Journal of biological chemistry* 281, 5106-5119.
- Palomero, T., Lim, W.K., Odom, D.T., Sulis, M.L., Real, P.J., Margolin, A., Barnes, K.C., O'Neil, J., Neubergh, D., Weng, A.P., et al.** (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18261-18266.

- Paramithiotis, E., Jacobsen, K.A., e Ratcliffe, M.J.** (1995). Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius. *The Journal of experimental medicine* 181, 105-113.
- Parreira, L., Neves, H., e Simoes, S.** (2003). Notch and lymphopoiesis: a view from the microenvironment. *Semin Immunol* 15, 81-89.
- Pascoal, S., Carvalho, C.R., Rodriguez-Leon, J., Delfini, M.C., Duprez, D., Thorsteinsdottir, S., e Palmeirim, I.** (2007). A molecular clock operates during chick autopod proximal-distal outgrowth. *Journal of molecular biology* 368, 303-309.
- Payne, L.N.** (1971). *The lymphoid System (Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl: Academic Press, London, New York,)*.
- Petrie, H.T., e Zuniga-Pflucker, J.C.** (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 25, 649-679.
- Pike, K.A., Baig, E., e Ratcliffe, M.J.** (2004). The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Igalpha and Igbeta in B-cell development. *Immunological reviews* 197, 10-25.
- Poulson, D.F.** (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 23, 133-137.
- Poulson, D.F.** (1945). *Chromosomal Control of Embryogenesis in Drosophila*, Vol 79 (The University of Chicago Press).
- Prescott, D.M.** (2008). *Methods in Cell Biology* (Academic Press/Elsevier).
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., et al.** (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., e Aguet, M.** (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-558.
- Radtke, F., Fasnacht, N., e Macdonald, H.R.** (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity* 32, 14-27.
- Ratcliffe, M.J.** (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and comparative immunology* 30, 101-118.
- Ratcliffe, M.J.H.** (1989). Development of the avian B lymphocyte lineage. *Crit Rev Poult Biol* 2, 207-234.
- Rawlings, D.J., Quan, S.G., Kato, R.M., e Witte, O.N.** (1995). Long-term culture system for selective growth of human B-cell progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 1570-1574.
- Reynaud, C.A., Anquez, V., Dahan, A., e Weill, J.C.** (1985). A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell* 40, 283-291.
- Reynaud, C.A., Imhof, B.A., Anquez, V., e Weill, J.C.** (1992). Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *The EMBO journal* 11, 4349-4358.
- Ribatti, D., Crivellato, E., e Vacca, A.** (2006). The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clinical and experimental immunology* 145, 1-4.
- Rodewald, H.R.** (2008). Thymus organogenesis. *Annual review of immunology* 26, 355-388.
- Romanoff, A.L.** (1960). *The avian embryo: structural and functional development* (Macmillan).
- Rothenberg, E.V., Moore, J.E., e Yui, M.A.** (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nature reviews Immunology* 8, 9-21.
- Sayegh, C.E., Demaries, S.L., Pike, K.A., Friedman, J.E., e Ratcliffe, M.J.** (2000). The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development. *Immunological reviews* 175, 187-200.
- Schmitt, T.M., e Zuniga-Pflucker, J.C.** (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.
- Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., e Zuniga-Pflucker, J.C.** (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200, 469-479.
- Schweisguth, F.** (2004). Regulation of notch signaling activity. *Current biology : CB* 14, R129-138.

- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., e Ohashi, P.S.** (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annual review of immunology* 17, 829-874.
- Siatskas, C., e Boyd, R.** (2000). Regulation of chicken haemopoiesis by cytokines. *Developmental and comparative immunology* 24, 37-59.
- Sowder, J.T., Chen, C.L., Ager, L.L., Chan, M.M., e Cooper, M.D.** (1988). A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *The Journal of experimental medicine* 167, 315-322.
- Stern, C.D.** (2004). The chick embryo--past, present and future as a model system in developmental biology. *Mechanisms of development* 121, 1011-1013.
- Szenberg, A.** (1977). Ontogeny of myelopoietic precursor cells in the chicken embryo. *Advances in experimental medicine and biology* 88, 3-11.
- Thompson, C.B., e Neiman, P.E.** (1987). Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell* 48, 369-378.
- Toivanen, A., Eskola, J., e Toivanen, P.** (1976). Restorative effects of different embryonic cells transplanted into immunodeficient chick embryos. *Annales d'immunologie* 127, 923-929.
- Tonegawa, S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tsai, S., Fero, J., e Bartelmez, S.** (2000). Mouse Jagged2 is differentially expressed in hematopoietic progenitors and endothelial cells and promotes the survival and proliferation of hematopoietic progenitors by direct cell-to-cell contact. *Blood* 96, 950-957.
- van der Burg, M., e Gennery, A.R.** (2011). Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *European journal of pediatrics* 170, 561-571.
- Varga, I., Pospisilova, V., Jablonska, V., Sisovsky, V., Galfiova, P., Polak, S., e Adamkov, M.** (2010). Thymic Hassall's bodies of children with congenital heart defects. *Bratislavske lekarske listy* 111, 552-557.
- Vargesson, N., Patel, K., Lewis, J., e Tickle, C.** (1998). Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mechanisms of development* 77, 197-199.
- Varnum-Finney, B., Purton, L.E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K.A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G., et al.** (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 91, 4084-4091.
- Veistinen, E., e Lassila, O. (2005). Bursa of Fabricius. In *Encyclopedia of Life, L. Sciences* Chichester: John Wiley & Sons, ed.
- Weng, A.P., Millholland, J.M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M.L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., et al.** (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development* 20, 2096-2109.
- Wharton, K.A., Johansen, K.M., Xu, T., e Artavanis-Tsakonas, S.** (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-581.
- Wilson, A., MacDonald, H.R., e Radtke, F.** (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *The Journal of experimental medicine* 194, 1003-1012.
- Wilson, T.J., Davidson, N.J., Boyd, R.L., e Gershwin, M.E.** (1992). Phenotypic analysis of the chicken thymic microenvironment during ontogenic development. *Developmental immunology* 2, 19-27.
- Wu, L., Antica, M., Johnson, G.R., Scollay, R., e Shortman, K.** (1991). Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *The Journal of experimental medicine* 174, 1617-1627.
- Wu, L., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S., e Griffin, J.D.** (2000). MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nature genetics* 26, 484-489.
- Yassine, F., Feddecka-Bruner, B., e Dieterlen-Lievre, F.** (1989). Ontogeny of the chick embryo spleen--a cytological study. *Cell differentiation and development : the official journal of the International Society of Developmental Biologists* 27, 29-45.
- Zolkiewska, A.** (2008). ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2056-2068.

Apêndice:

Apêndice I:

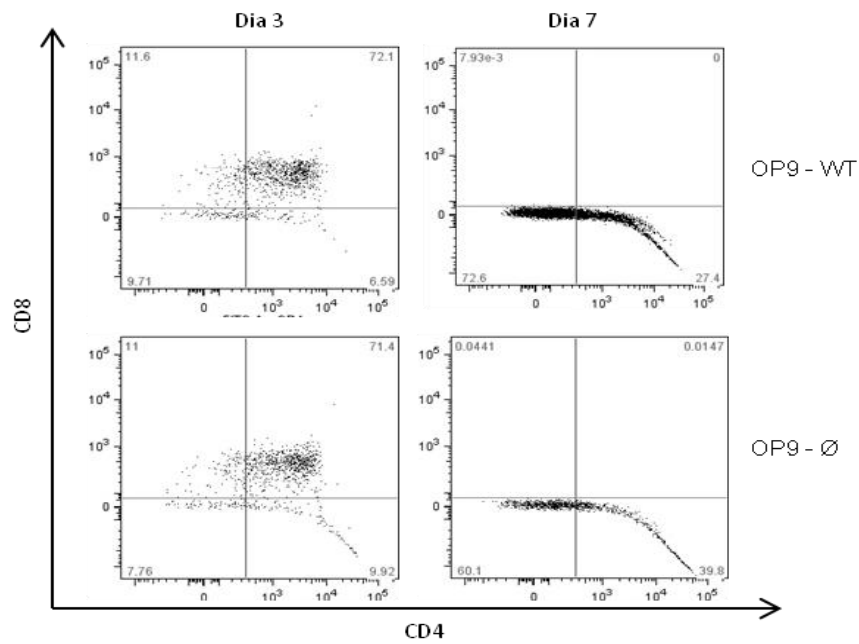


Figura I.1. Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores CD4 e CD8. Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores CD4 e CD8 por células hematopoéticas co-cultivadas com OP9-WT (Painel superior) e células OP9 apenas transduzidas com o vector retrovira I (OP9-Ø, painel inferior) em três dias diferentes de co-cultura.

Apêndice II:

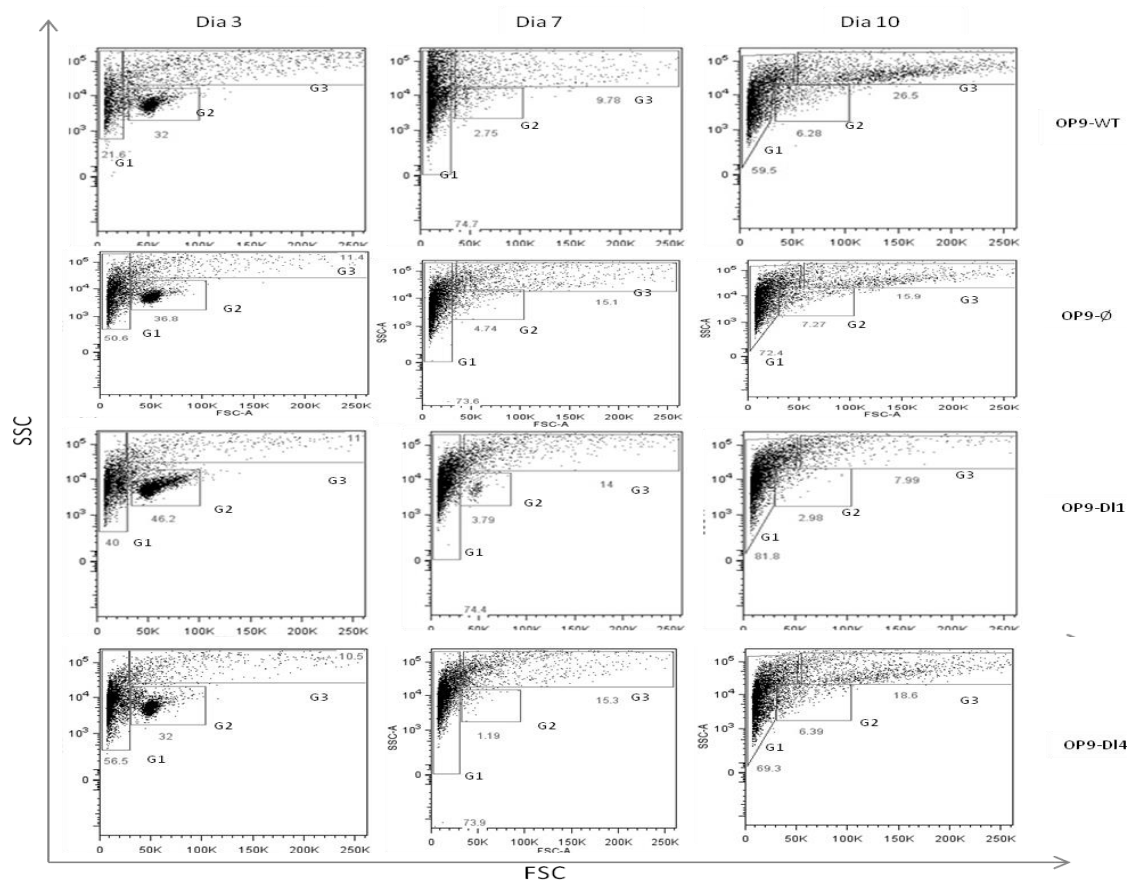


Figura II.1. Tamanho e complexidade citoplasmática das células de timo E13 de galinha co-cultivadas nas diferentes condições estudadas. Tamanho e complexidade citoplasmática (parâmetros FSC e SSC) das células co-cultivadas com células OP9-WT (painel superior), transduzidas com vetor Ø (OP9- Ø), transduzidas com DI1 (OP9-DI1) e transduzidas com DI4 (OP9-DI4). G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2; G3 – Subpopulação 3.

Apêndice III:

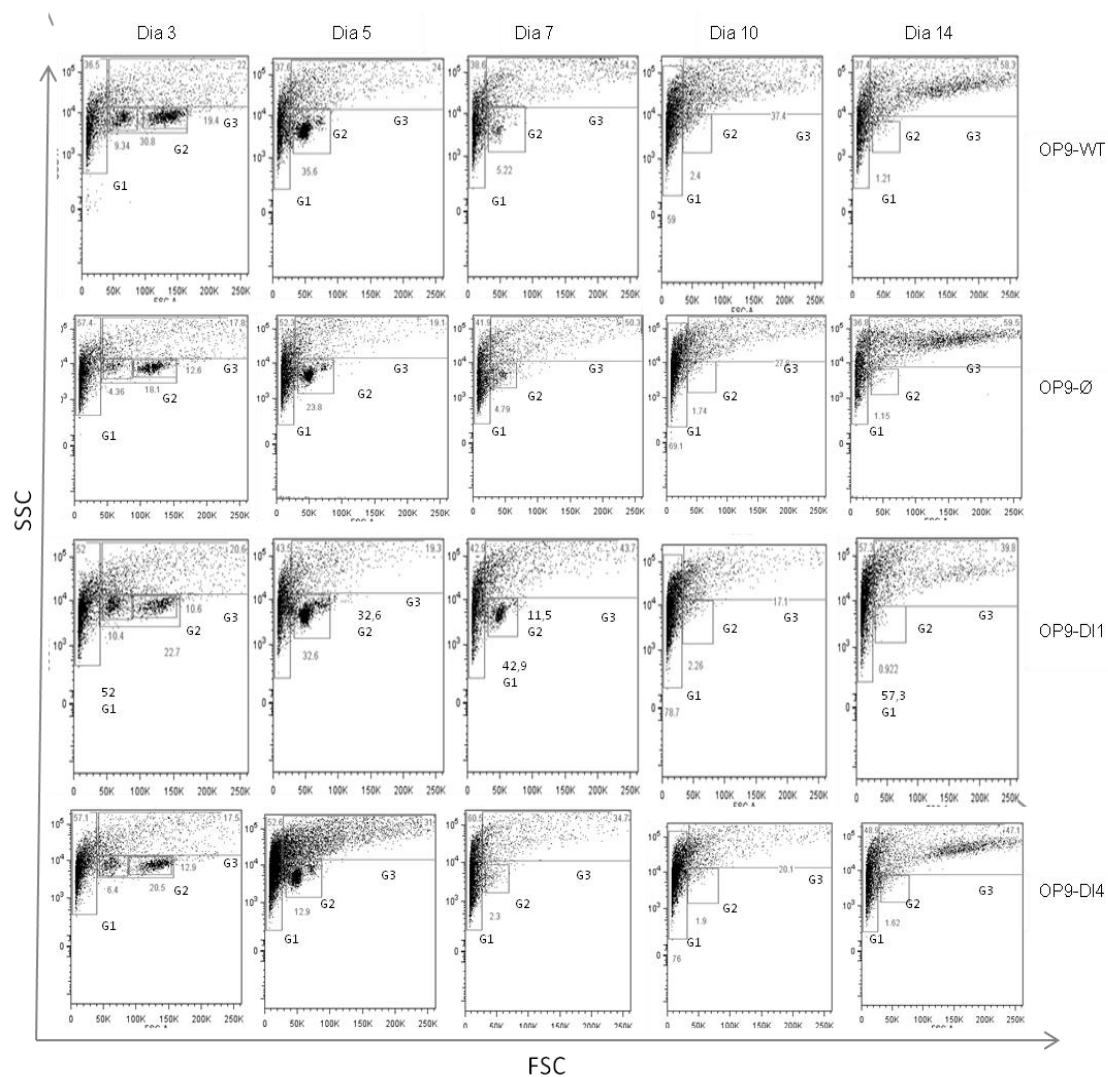


Figura III.1. Tamanho e complexidade citoplasmática das células isoladas de timo E15 co-cultivadas.

Tamanho e complexidade citoplasmática (parâmetros FSC e SSC) das células co-cultivadas com células OP9-WT (painel superior), transduzidas com vetor Ø (OP9- Ø), transduzidas com DI1 (OP9-DI1) e transduzidas com DI4 (OP9-DI4. G1 – Subpopulação 1; G2 – Subpopulação 2; G3 – Subpopulação 3

Apêndice IV:

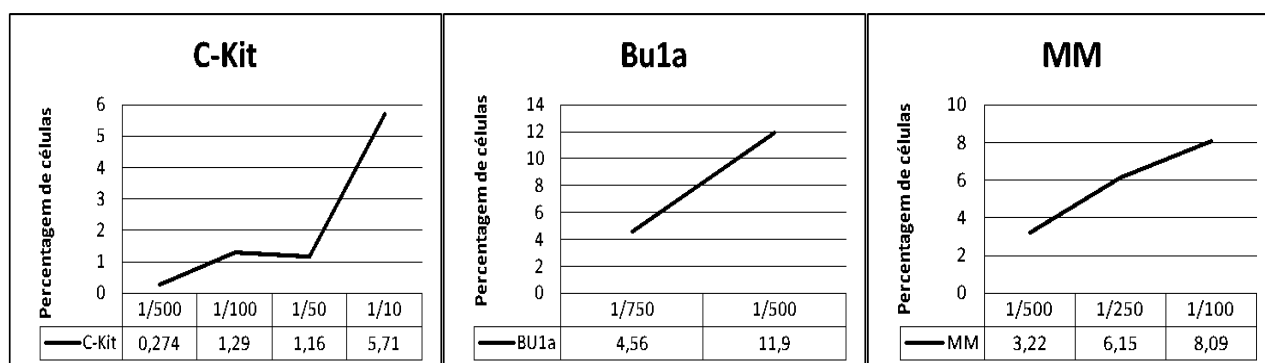


Figura IV.1. Otimização da concentração de uso dos anticorpos. Otimização da concentração de uso dos anticorpos C-Kit (esquerda), Bu1a (centro), MM (direita) em células isoladas de baços E13 com diferentes concentrações de anticorpo.

t

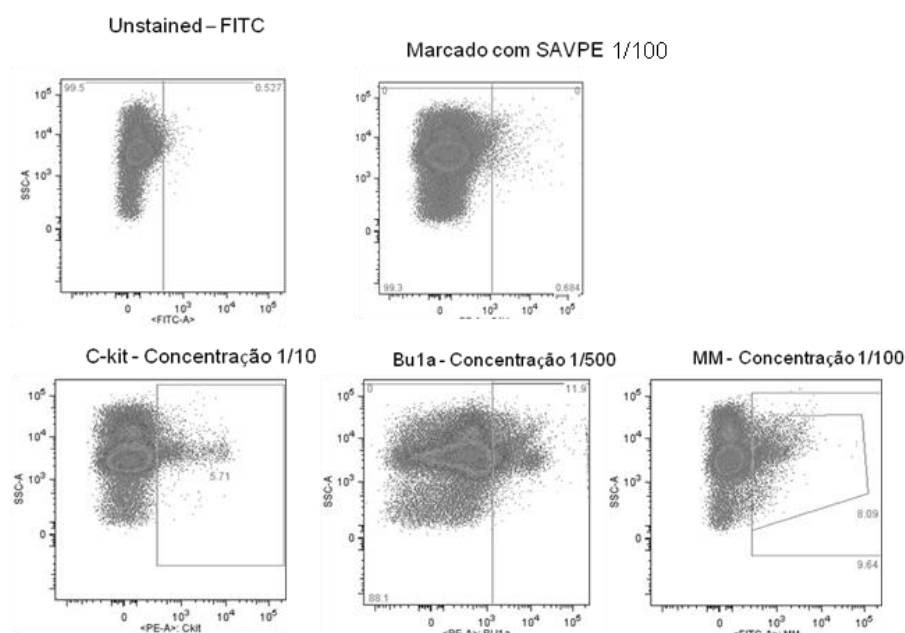


Figura IV.2. Gráficos de citometria (dot plots) das melhores concentrações de trabalho obtidas. No painel superior temos os controles (à esquerda temos células não marcadas e a direita temos células marcadas com streptavidina (SAVPE) na segunda fluorescência (controlo da conjugação Bu1a+SAVPE)); No painel inferior temos células marcadas com C-Kit na segunda fluorescência (esquerda), Bu1a+SAVPE segunda fluorescência (centro), MM primeira fluorescência (direita).

Apêndice V:

Teste do anticorpo Bu1a na Bursa:

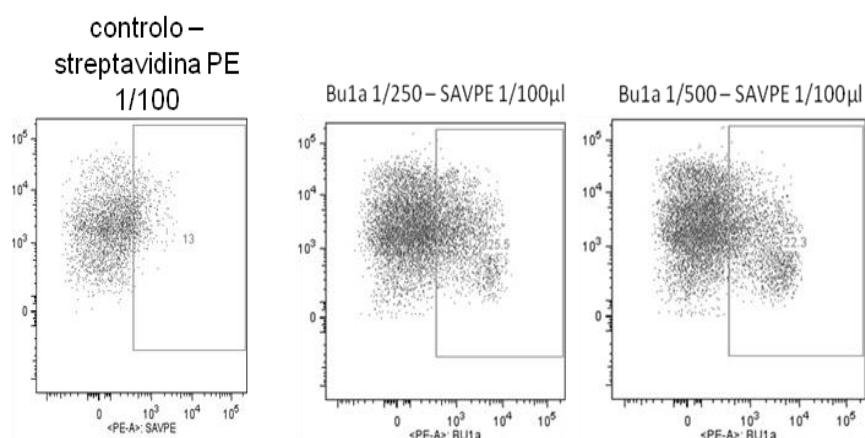


Figura V.1. Gráficos de citometria (dot plots) do teste do anticorpo Bu1a em células isoladas de Bursas E19. À esquerda, temos o controlo (células marcadas com streptavidina 1/100 (SAVPE) – controlo da conjugação Bu1a+SAVPE); Ao centro temos Bu1a+SAVPE (Bu1a 1/250 – SAVPE 1/100), à direita temos Bu1a+SAVPE (Bu1a 1/500 – SAVPE 1/100),

Apêndice VI:

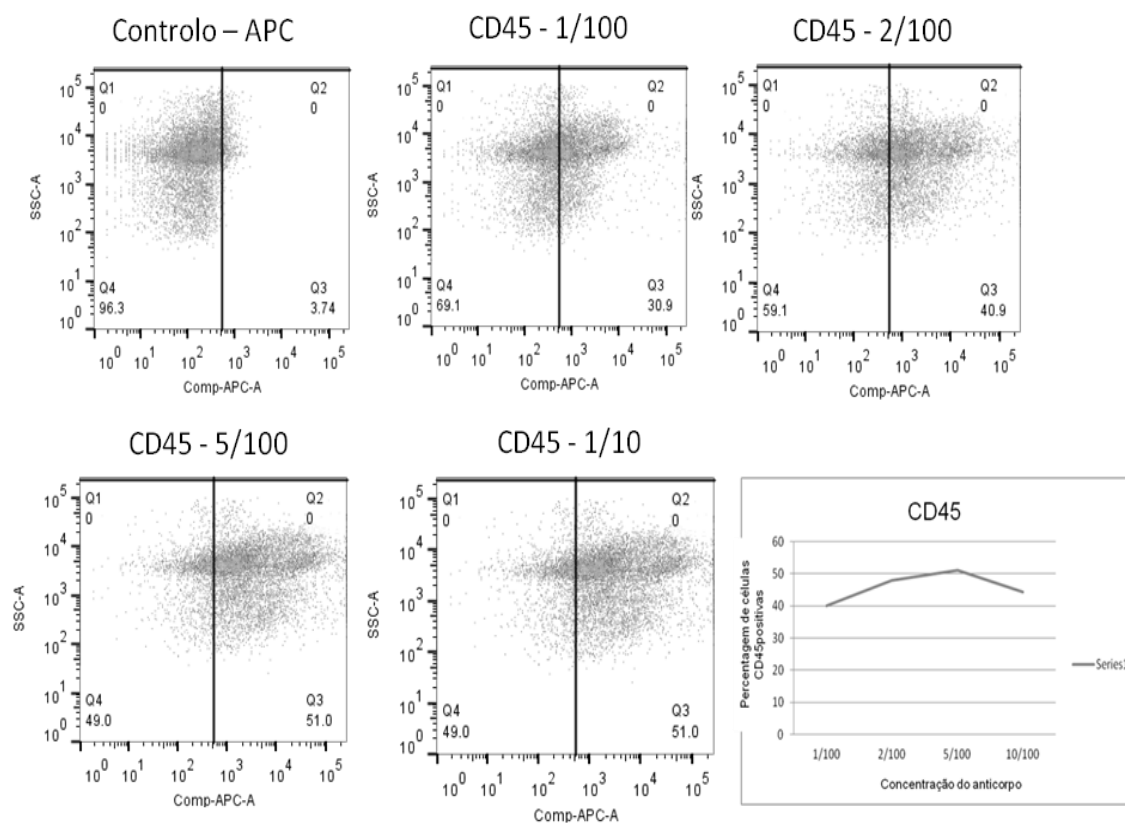


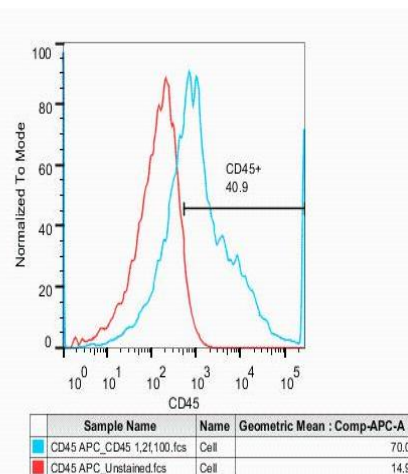
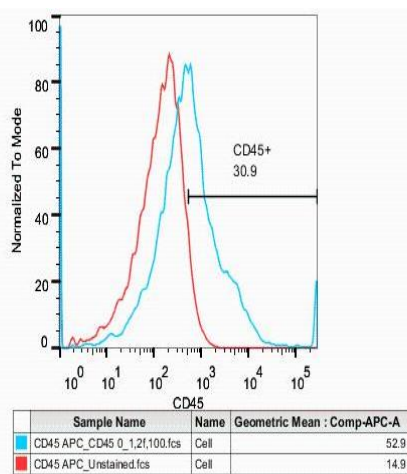
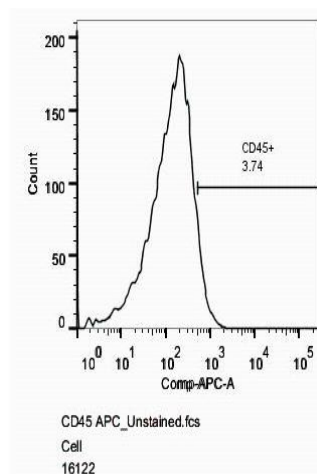
Figura VI.1. Gráficos (dot plots) de citometria da optimização do anticorpo CD45 na quarta fluorescência (APC) em células isoladas de baços E10. No painel superior, temos o controlo sem anticorpo (à esquerda), a concentração de CD45 1/100 (ao meio) e a concentração de CD45 2/100 (à direita); No painel inferior a concentração de CD45 5/100 (esquerda), concentração CD45 1/10 (centro), e o gráfico das várias concentrações (direita).

Apêndice VII:

Controlo – APC

CD45 - 1/100

CD45 - 2/100



CD45 - 5/100

CD45 - 1/10

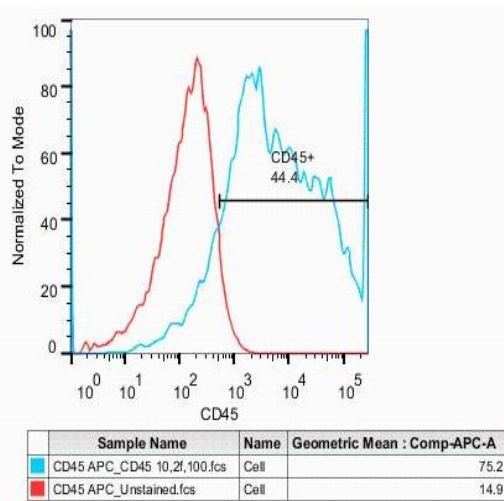
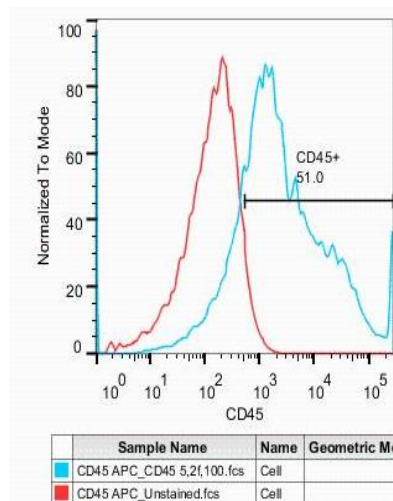


Figura VII.1. Gráficos de citometria da optimização do anticorpo CD45 com células isoladas de baços E10. No painel superior temos o controlo (à esquerda), a concentração de CD45 1/100 (ao meio) e a concentração de CD45 2/100; No painel inferior a concentração de CD45 5/100 (esquerda), CD45 1/10 (direita)

